

Funktionale Genomanalyse von *Pseudomonas putida* KT2440

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Daniela Regenhardt

aus Osterode am Harz

1. Referent: Prof. Dr. Kenneth N. Timmis

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 24.04.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 23.07.2003

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

- Regenhardt, D., H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernandez, C. Strömpl, E.R.B. Moore, and K. N. Timmis. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environmental Microbiology* 4: 912-5 (2002).
- Heim, S., M. Ferrer, H. Heuer, D. Regenhardt, M. Nimtz, and K.N. Timmis. Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *P. aeruginosa* strain PAO1 to iron-deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environmental Microbiology* 5: 1257-1269 (2003).

Tagungsbeiträge

- D. Regenhardt, S. Heim, E.R.B. Moore, M. Strätz and K.N. Timmis: Functional Genomics of *Pseudomonas putida* KT2440 (Kurzvortrag). In Situ Monitoring of Plasmid Transfer, Workshop 3 (MECBAD) in Kopenhagen, Dänemark (2000)
- D. Regenhardt, S. Heim, E.R.B. Moore, K.N. Timmis, and M. Strätz: Functional Genomics of *Pseudomonas putida* KT2440-New Insights into Plasmid Biology (Poster/Kurzvortrag). 2nd Symposium of the EU-Concerted Action on "Mobile Genetic Elements" Contribution to Bacterial Adaptability and Diversity (MECBAD) in Prag, Tchechische Republik (2000)
- D. Regenhardt, S. Heim, M. Strätz, C. Weinel, C. Kiewitz, K.N. Timmis and B. Tümmeler: Functional Genomics of *Pseudomonas putida* KT2440 (Poster). Jahrestagung der VAAM in Oldenburg (2001)
- D. Regenhardt, S. Heim, M. Strätz, and K.N. Timmis: Functional Genomics of *Pseudomonas putida* KT2440 (Poster). *Pseudomonas*-Tagung in Brüssel, Belgien (2001)
- D. Regenhardt, S. Heim, M. Strätz, and K.N. Timmis: A proteomic approach: Colonisation of the rhizosphere of wheat by *Pseudomonas putida* KT2440 (Kurzvortrag). Jahrestagung der VAAM in Göttingen (2002)

Für meine Eltern und meine Schwester Nicole

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	8
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	8
2.2 Nährmedien und Zellanzucht	9
2.2.1 Komplexmedien	9
2.2.1.1 Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	9
2.2.1.2 EM- Medium (LB-Medium, mod.)	9
2.2.1.3 SOB-Medium	9
2.2.1.4 SOC-Medium	9
2.2.1.5 Caso-Medium	10
2.2.2 Mineralmedien	10
2.2.2.1 Minimalmedium zur Anzucht von <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (10-fach konzentriert)	10
2.2.2.2 Low phosphat Medium (Neidhardt <i>et al.</i> , 1974, mod.)	10
2.2.2.3 Nährlösung zur Anzucht von Getreidepflanzen (Hoagland und Arnon, 1950, mod.)	11
2.2.3 Medienzusätze	11
2.2.4 Wachstumsbedingungen	12
2.2.5 Stammhaltung und Reinheitskontrolle	12
2.2.6 Bestimmung der Bakteriendichte über die optische Dichte	13
2.2.7 Nachweis der Cytochromoxidase	13
2.2.8 Zellernte	13
2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	14
2.3.1 Pufferlösungen	14
2.3.2 Behandlung von Geräten und Lösungen	14
2.3.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Bakterienzellen	14
2.3.4 Präparative Plasmid-Isolierung	16
2.3.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	16
2.3.5.1 Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion	16
2.3.5.2 Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	16
2.3.5.3 Mikrodialyse von DNA	17
2.3.6 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA	17
2.3.7 Größenauftrennung von DNA und DNA-Fragmenten	17
2.3.7.1 Agarosegelelektrophorese von DNA	17
2.3.7.2 DNA-Längenstandards	18

2.4	Enzymatische Modifikation von DNA	19
2.4.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	19
2.4.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	19
2.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten	19
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.5.1	Arbitrary PCR zur Identifizierung der transposonflankierenden DNA-Sequenz	23
2.5.2	Genomische Fingerprintanalyse mittels repetitiver Polymeraseketten Reaktion (rep-PCR)	24
2.6	DNA-Transfer in Bakterien und Selektion rekombinanter Klone	25
2.6.1	Übertragung von Plasmid-DNA aus einem konjugationsfähigen <i>E. coli</i> -Stamm als Donor auf den Rezipientenstamm <i>P. putida</i> KT2440	25
2.6.2	Elektroporation in <i>E. coli</i>	26
2.6.3	Elektroporation in <i>P. putida</i> KT2440	27
2.6.4	Der X-Gal-Test zur Selektion rekombinanter Klone	27
2.7	Transposonmutagenese in <i>P. putida</i> KT2440	28
2.8	Screening der <i>P. putida</i> KT2440::Tn5(Kan ^r)-Mutanten	29
2.8.1	Screening auf Auxotrophie	29
2.8.2	Screening auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung	29
2.8.3	Screening auf Siderophorbildung unter eisenlimitierten Bedingungen	30
2.8.4	Screening auf oxidativen Stress	30
2.8.5	Screening auf die geißelgesteuerte Bewegung	31
2.9	Sequenzierung am ABI PRISM™ 377 und ABI PRISM™ 3100 Genetic analyser	31
2.9.1	Auswertung der Sequenzdaten	32
2.10	Spezifischer Nachweis von DNA	33
2.10.1	Southern Blot	33
2.10.2	Digoxigenin (DIG)-markierung von Oligonukleotiden mittels PCR	34
2.10.3	DNA-DNA Hybridisierung	34
2.10.4	Nachweis DIG markierter DNA	35
2.11	Arbeiten mit Weizensamen und Weizenkeimlingen	36
2.11.1	Oberflächensterilisation	36
2.11.2	Sterilitätskontrolle und Keimung	36
2.11.3	Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln durch <i>P. putida</i> KT2440 mit nachfolgender Zellernte	37
2.11.3.1	³⁵ S-Methionin-Labeling von Proteinen	37

2.11.4	Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln durch Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mit nachfolgender Zellernte	38
2.11.5	Herstellung einer Wurzelexudatlösung aus Weizenkeimlingen	38
2.12	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.13	Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten	39
2.13.1	Durchführung der 2D-PAGE	40
2.13.1.1	Proteinextraktion	40
2.13.1.2	Phenolextraktion mit anschließender Acetonfällung der Proteine	41
2.13.1.3	Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IEF-IPG)	42
2.13.1.4	Äquilibrieren der IPG-Streifen	43
2.13.1.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.13.2	Proteinfärbung	45
2.13.2.1	Kolloidale Coomassiefärbung	45
2.13.2.2	Silberfärbung (BLUM <i>et al.</i> , 1987, mod.)	45
2.13.2.3	Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium II tris (bathophenanthrolin disulfonat, RuBPs) (Rabilloud <i>et al.</i> , 2001, mod.)	46
2.14	Computerunterstützte Gelauswertung	47
2.15	Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung	47
2.15.1	Entfärben von Proteinspots	48
2.15.1.1	Coomassiegefärbte Proteinspots	48
2.15.1.2	Silbergefärbte Proteinspots mit Farmer's Reducer (Gharahdaghi <i>et al.</i> , 1999, mod.)	48
2.15.1.3	RuBPs gefärbte Proteinspots (Rabilloud <i>et al.</i> , 2001, mod.)	48
2.15.2	Proteolytischer Verdau von Proteinen und Extraktion der Peptide	49
2.15.3	Guanidinierung von Peptiden	49
2.15.4	Aufreinigung von Peptiden mittels ZIP TIP TM für die massenspektrometrische Analyse	50
2.16	Massenspektrometrie	50
2.16.1	MALDI-Massenspektrometrie	51
2.16.2	Grundprinzip der Q-TOF	51
2.16.3	Auswertung massenspektrometrischer Daten	52
2.17	Mikroskopie	52
2.17.1	Elektronenmikroskopie	52
2.17.2	Fluoreszenzmikroskopie	53
2.18	Chemikalien, Biochemikalien und Geräte	53

3	Experimente und Ergebnisse	56
3.1	Generierung und Analyse von Transposondefektmutanten in <i>P. putida</i> KT2440	56
3.1.1	Einsatzmöglichkeiten von Fluoreszenzmarkern zur Selektion und Detektion von Transkonjuganten in <i>P. putida</i> KT2440	57
3.1.2	Transposonmutagenese mit dem EZ::TN™ <Kan-2> Tnp Transposome™ in <i>P. putida</i> KT2440	58
3.1.3	Screening und genetische Analyse der <i>P. putida</i> KT2440::Tn5(Kan ^r)- Mutanten	59
3.1.4	DNA-DNA-Hybridisierung zum Nachweis der Tn5-Integration in das <i>P.</i> <i>putida</i> KT2440-Genom	61
3.1.5	Aufbau einer genotypisch charakterisierten <i>P. putida</i> KT2440::Tn5(Kan ^r)- Mutantenbibliothek	62
3.1.6	Screening nach auxotrophen Mutanten	63
3.1.6.1	Auxotrophe Mutanten mit Integration in die Gene der Untereinheiten der Carbamoylphosphatsynthase	66
3.1.7	Screening nach Siderophordefektmutanten	67
3.1.7.1	Oxidative Stressantwort der Siderophordefektmutanten	70
3.1.8	Screening nach Defektmutanten in der Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen	72
3.1.9	Untersuchung der Siderophordefekt- und Biofilmdefektmutanten auf deren Fähigkeit zur Geißelbewegung	76
3.1.9.1	Untersuchung der Flagellinexpression (FliC) in den unbeweglichen Mutanten	77
3.1.9.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Geißeln in den unbeweglichen Mutanten	78
3.1.10	Fähigkeit ausgesuchter Biofilmdefektmutanten zur Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtypstamm	79
3.2	Proteomanalyse von <i>P. putida</i> KT2440 in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingen	80
3.2.1	Auswahl eines hydroponischen Nährlösungssystem	82
3.2.2	Überprüfung der Reinheit von <i>P. putida</i> KT2440 im Kolonisierungsassay mittels genomischer Fingerprintanalyse	82
3.2.3	Änderung des Proteommusters von <i>P. putida</i> KT2440 unter dem Einfluss von Weizenkeimlingswurzeln	84

3.2.4	Proteinexpression beim Wachstum von <i>P. putida</i> KT2440 in unterschiedlichen Nährmedien	89
3.2.5	<i>De novo</i> synthetisierte Proteine von <i>P. putida</i> KT2440 in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingen	93
4	Diskussion	96
4.1	Transposonmutagenese als Werkzeug zur Genomanalyse in <i>P. putida</i> KT2440	96
4.1.1	Auswirkung von Mutationen auf die Adhäsionsfähigkeit von <i>P. putida</i> KT2440 an Oberflächen	98
4.1.2	Auswirkung von Mutationen auf die Synthese und/oder Ausscheidung von Pyoverdinen in <i>P. putida</i> KT2440	104
4.2	Analyse des Proteommusters von <i>P. putida</i> KT2440 beim Wachstum in der Rhizosphäre	116
5	Zusammenfassung	120
6	Literaturverzeichnis	122
7	Anhang	138
7.1	Lokalisierung der Tn5-Integration in näher charakterisierte Gene	138
7.2	Identifizierung der transposonflankierenden Region der <i>P. putida</i> KT2440::Tn5(Kan ^r)-Mutanten	143

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'- triphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CDP	Dinatrium 4-chloro-3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan 3,2-(5' chloro) tricyclo-decan}-4 yl) phenylphosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dest	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	Et alteri (und andere)
F	Farad
g	Gramm

ggf.	gegebenenfalls
G	Guanin
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
λ	Lambda
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
m	milli (10^{-3}), Meter
min	Minute
mM	millimolar
mod.	modifiziert
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
μ	mikro (10^{-6})
MW	Molekulargewicht
mRNA	messenger ("Boten") Ribonukleinsäure
N-	Amino-
n	nano (10^{-9})
OD	Optische Dichte
o. g.	oben genannte(n)
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstandes)
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
p. a.	Pro analysis, zur Analyse
2D PAGE	Zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönlich(e)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	piko-Mol
®	eingetragenes Warenzeichen

r	resistent
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RuBPS	Ruthenium II tris (bathophenantholon disulfat)
σ	Sigma
s	Sekunde
s.	siehe
³⁵ S	Radioaktiv markierter Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TIGR	The Institute of Genomic Research
™	Warenzeichen
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit), Uracil
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
ü/N	über Nacht
vgl.	vergleiche
Vs.	Version
v/v	Volumenprozent
V	Volt (Einheit der Spannung)
Vol	Volumen
w/v	Gewichtsanteil
w/w	Gewichtsprozent
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

1 Einleitung

In der Familie der Pseudomonadaceae werden Gram-negative, stäbchenförmige, polar begeißelte Bakterien, die keine Sporen oder andere Dauerformen bilden, zusammengefasst. Diese morphologischen Kennzeichen teilen Gattungen der Pseudomonadaceae wie z. B. *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Azotobacter* und *Cellvibrio* (Garrity *et al.*, 2001). Vertreter dieser zu den γ -Proteobakterien gehörenden Familie kommen ubiquitär vor und leben vornehmlich chemoorganoheterotroph als aerobe Saprophyten im Boden, Wasser, Abwasser, marinen Gewässern oder in Assoziation mit Pflanzen, Tieren und Menschen (Palleroni, 1986).

Vertreter der Gattung *Pseudomonas* verkörpern den Prototyp der Familie und spielen besonders bei ökologischen und biotechnologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer genetischen, metabolischen und physiologischen Diversität sind sie in viele ökologische Prozesse involviert, wie z. B. Mineralisierungsprozesse natürlicher und xenobiotischer organischer Substanzen, Förderung von Pflanzenwachstum (Palleroni, 1986; Liao, 1989; Defago und Haas, 1990; Lugtenberg *et al.*, 1991) und Schutz der Pflanzen vor pflanzenpathogenen Mikroorganismen (Gamliel und Katan, 1992; O'Sullivan und O'Gara, 1992). Sie sind aber auch Bestandteil der Mikroflora verdorbener Lebensmittel (Barret *et al.*, 1986) und einige Arten besitzen pflanzen-, tier- und/oder humanpathogenen Charakter (Hirano und Upper, 1983; Howard *et al.*, 1994; Bergen, 1981; Hungerford, 1990). Außerdem zeichnen sie sich durch das häufige Auftreten von Resistenzen gegenüber Antibiotika (Wiedemann und Atkinson, 1991), Schwermetallen, Desinfektionsmitteln und Detergenzien aus. Die Resistenzausprägung und die Fähigkeit heterozyklische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe abzubauen, sind meistens plasmidkodiert. Generell wurde bei Pseudomonaden eine große Vielfalt an konjugativen oder mobilen Plasmiden (z. B. TOL, RP4, RSF1010) beschrieben (Frey *et al.*, 1992).

Pseudomonas putida gehört zur rRNA-Gruppe I (*Pseudomonas sensu stricto*), der größten Gruppe innerhalb der Gattung *Pseudomonas*. In dieser Gruppe sind fluoreszierende Arten (wie z. B. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*) und nicht-fluoreszierende Arten (wie z. B. *P. fragi*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*) vertreten. *P. putida* kolonisiert Böden, Wasser und ist auf Oberflächen lebender Organismen wie z. B. Pflanzenwurzeln von Kartoffel, Gerste, Mais, Tomate (de Weger *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1998) anzutreffen. Aus diesen zahlreichen Habitaten (Gilardi, 1991)

wurden verschiedene Stämme isoliert, wobei das relevante Merkmal bei allen die Fähigkeit zur Degradation xenobiotischer, heterozyklischer und aromatischer Komponenten war. Die Verwertung vorliegender Substrate basiert in der Regel auf plasmidkodierten Abbauwegen. Beispiele solch katabolischer Plasmide sind das TOL-Plasmid pWWO (Williams und Murray, 1974), das NAH7-Plasmid (Dunn und Gunsalus, 1973) und das CAM-Plasmid (Rheinwald *et al.*, 1973), die die Abbauwege für Toluol/Xylen, Naphthalin und Kampfer kodieren. Viele Stämme von *P. putida* besitzen ebenso eine Vielfalt chromosomalkodierter Abbauwege, die der Verwertung natürlich vorkommender organischer Substanzen dienen.

Da keine pflanzen- oder tierpathogenen Stämme von *P. putida* bekannt sind, bietet sich dieser Stamm als idealer Modellorganismus zur Entwicklung offener biotechnologischer Anwendungen wie der Bioremediation an. *P. putida* KT2440 ist ein spontan entstandener, plasmidfreier Abkömmling des Toluol-abbauenden Bakteriums *P. putida* mt-2 (Nakazawa und Yokota, 1973). Dieser ursprünglich als *Pseudomonas arvilla* mt-2 klassifizierte Stamm wurde von dem Japaner Hosakawa im Laboratorium von Takeda isoliert und anschließend von Yamanaka identifiziert (Nozaki *et al.*, 1963). Nozaki gelang die Kristallisation des für den Stamm charakteristischen Enzyms, der Katechol-2,3-Oxygenase, die beim Phenolabbau die Meta-Spaltung von Katechol in 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd katalysiert (Nozaki *et al.*, 1963). Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppen Feist und Hegemann (Feist und Hegemann, 1969) sowie Williams und Murray (Murray *et al.*, 1972; Williams und Murray, 1974) zeigten, dass *P. putida* (*arvilla*) mt-2 die Substrate Benzol, m- und p-Toluol auch über den *meta*-Abbauweg metabolisiert, während die bisher bekannten *P. putida*-Stämme dieses hingegen über den *ortho*-Abbauweg abbauen. Diese Abbaueigenschaft beruht auf dem Vorhandensein des TOL-Plasmids im Organismus (Williams und Murray, 1974). In den folgenden Jahren wurden weiterführende Untersuchungen mit diesem *P. putida*-Stamm durchgeführt, wobei der Wildtypstamm vielfach als *P. putida* (*arvilla*) mt-2 bzw. PaW1 (*P. arvilla* Wales) und entsprechende Mutantenstämme mit PaW + Nummer bezeichnet wurden (Williams und Murray, 1974).

Der *P. putida*-Stamm KT2440 ist neben seinem Parentalstamm einer der am besten charakterisierten *P. putida*-Stämme (Bagdasarian *et al.*, 1981; Regenhardt *et al.*, 2002). Aufgrund eines abgeschwächten Modifikations- und Restriktionssystems (Bagdasarian *et al.*, 1981) dient KT2440 daher als effizienter Wirt für die Expression heterologer DNA (Ramos *et al.*, 1987). Seit 1981 gilt *P. putida* KT2440 als biologische Sicherheitsmaßnahme B1 nach der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) und

war vom US National Institute of Health (NIH) als erstes Gram-negatives Bodenbakterium als EK1 Sicherheitsklonierungssystem eingestuft worden (Federal Register, 1982). Seitdem wurden zahlreiche "Genetic Tools" besonders Minitransposons zur Analyse und Manipulation entwickelt (Herrero *et al.*, 1990; de Lorenzo *et al.*, 1990 und 1992). Der Stamm KT2440 und sein rifampicin-resistenter Abkömmling KT2442 werden vorzugsweise zur heterologen Expression von Genen aus Bodenbakterien eingesetzt, die für Enzyme und deren Regulation kodieren, die Kohlenwasserstoffe und aromatische Xenobiotika abbauen. So wird der Stamm KT2440 zur Entwicklung einer Reihe von unterschiedlichen biotechnologischen Anwendungen wie z. B. der Entwicklung neuer katabolischer Abbaupfade für polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Herbizide sowie zum biologischen Plastikabbau genutzt (Ramos *et al.*, 1986, 1987; Rojo *et al.*, 1987; Erb *et al.*, 1997).

Kürzlich wurde *P. putida* KT2440 als effizienter Besiedler von Pflanzenwurzeln wie z. B. Weizen, Mais, Erdbeere, Zuckerrübe und Spinat beschrieben (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002). Er produziert das Pflanzenhormon Auxin und fördert die Primärblatt- und Seitenwurzelbildung von Erdbeerkeimlingen signifikant (Dr. J. Lottmann, pers. Mitteilung). Auch ist er in der Lage, durch Bildung und Ausscheidung von Siderophoren, die für Organismen lebenswichtigen Eisenionen effektiv zu binden, und auf diese Weise das Wachstum pflanzenpathogener Keime indirekt zu verhindern. Die Fähigkeit antibiotische Substanzen auszuschcheiden, und so die Pflanzen vor pflanzenpathogenen Keimen zu schützen, ist für *P. putida* KT2440 bisher nicht bekannt (Dr. G. Molinari, pers. Mitteilung), jedoch für verschiedene *P. fluorescens*-Stämme (Russo *et al.*, 1996; Nakata *et al.*, 2000). Möglicherweise eignet sich *P. putida* KT2440 auch als Modellorganismus für die Entwicklung neuer Biopestizide, als Carrier für die Agenzien, die das Pflanzenwachstum fördern sowie für die Phytorhizoremediation.

Die Bedeutung des *P. putida* KT2440-Stammes in der Ökologie und Biotechnologie erklärt die abgeschlossene Sequenzierung und laufende Genom- und Funktionsanalyse (Weinel *et al.*, 2002). Die derzeitige Funktionsanalyse von *P. putida* KT2440 sowie von *P. aeruginosa* PAO1 (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html>) und die laufende Sequenzierungs- und Funktionsanalyse von *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* PfO-1 und dem pflanzenpathogenen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>) ermöglicht die Aufklärung der genetischen Grundlagen für die Anpassungsfähigkeit und die metabolische Vielfalt dieser *Pseudomonas*-Stämme. Es können u. a. Aussagen über die Genomgröße, die Anordnung der Gene und deren Regulation sowie Promotor- und Operonstrukturen

gemacht werden. Aufgrund der Daten aus bereits durchgeführten mikrobiellen Genomsequenzierungsprojekten (u. a. Bult *et al.*, 1996; Fleischmann *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1995; Goffeau *et al.*, 1996; Blattner *et al.*, 1997) können durch Sequenzdatenvergleich auf Nukleinsäureebene wie auf Proteinebene mögliche Voraussagen über die Anzahl an Genen mit zuweisbarer Funktion gemacht werden. Die derzeit schnell anwachsenden Kartierungs- und Sequenzdaten verschiedener Organismen (20.04.03: 119 vollständig sequenzierte Mikroorganismen; <http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/index.cgi?want=Published+Complete+Genomes>) können durch vergleichende Untersuchungen homologer Bereiche im Genom, die Suche nach unbekannten Genen und deren Charakterisierung erleichtern. So gibt die Restriktionskartierung, Information über die Anordnung von konservierten und variablen DNA-Regionen sowie über mögliche stattgefundenen Genrearrangements wie Insertion, Deletion und Inversion. Über die physikalische Kartierung können Unterschiede in der genetischen Ausstattung aufgedeckt werden, während der Sequenzvergleich Aussagen über die Diversität gemeinsamer Sequenzen zulässt. So ergab bereits die vergleichende Restriktionskartierung auf den Chromosomen der *Pseudomonas*-Referenzstämme *P. aeruginosa* PAO1 (6,3 Mb), *P. putida* KT2440 (6,2 Mb) und *P. fluorescens* SWB25 (6,6 Mb), dass die Anordnung und Ausstattung an Genen für die Biosynthese und den Intermediärstoffwechsel zwischen den Spezies sehr gut konserviert ist (Ramos-Diaz *et al.*, 1998). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Referenzstämme unterschiedliche Kopienzahlen von rRNA-Operons beinhalten, wobei *P. putida* KT2440 mit sieben (Weinel *et al.*, 2001), *P. fluorescens* SWB25 mit fünf (Rainey und Bailey, 1996) und *P. aeruginosa* PAO1 mit vier Kopien ausgestattet ist (Römling *et al.*, 1989; Ratnaningsih *et al.*, 1990). Das deutet bereits daraufhin, dass verschiedene Muster an Genrearrangements nicht nur zwischen den Arten, sondern auch innerhalb der gleichen Art stattgefunden haben.

Nach Abschluss der Sequenzierung und Annotation des *P. putida* KT2440-Genoms (6,2 Mb) mit einem durchschnittlichen molaren GC-Gehalt von 61,6 % (<http://www.tigr.org>; GenBank Accession No. AE0151451) wurden 5420 ORFs identifiziert von denen 3571 ORFs eine Funktion zugewiesen werden konnte. Weitere 600 ORFs (11,1 %) sind einzigartig in *P. putida* KT2440 und 1037 (19,1 %) kodieren für konservierte hypothetisch annotierte Proteine. Die Annotation belegte ein breites Repertoire an Regulatorgenen (9,13 %) und Genen für Transportsysteme (11,2 %). Die *in silico* Genomanalyse zeigte Stoffwechselwege, die dem Abbau aromatischer Komponenten dienen, vorwiegend Ligninderivaten, die während des Abbaus von Pflanzenmaterial entstehen könnten. Diese metabolische Vielfalt spiegelt sich auch

darin wieder, dass KT2440 im Vergleich zu bisher sequenzierten Mikroorganismen das größte Repertoire an putativen Transportern für aromatische Substrate besitzt. Weiterhin bestätigte die Genomanalyse von *P. putida* KT2440 die Avirulenz dieses als Sicherheitssystem eingestuften Bakteriums. Das *P. putida* KT2440-Genom zeichnet sich im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1-Genom durch eine größere Anzahl an TypI-Sekretionssystemen wie z. B. ABC-Transportern aus; typische Virulenzgene wie Exotoxine und spezifische hydrolytische Enzyme sowie Elemente des TypIII-Sekretionssystems fehlen dagegen (Nelson *et al.*, 2002). Gemeinsamkeiten mit pathogenen Spezies in Form von Genen, die für TypIV Pili und Adhäsionsproteine kodieren, scheinen demnach eher für die Besiedlung verschiedenster Oberflächen insbesondere für das Leben in der Rhizosphäre wichtig zu sein (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000).

Neben der Sequenzdatenauswertung und der vergleichenden Genomanalyse sind weitere Analysen notwendig, um genaue Aussagen über die Funktion, Regulation und Expression besonders von Genen mit unbekannter oder unsicherer Funktionszuordnung, sogenannter "orphan genes", machen zu können. So schließt sich an die Totalsequenzierung des *P. putida* Genomprojektes die Funktionsanalyse mit der Untersuchung der globalen Genexpression in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen sowohl auf mRNA-Ebene (Transkriptom) als auch auf Proteinebene (Proteom) an (Tümmler und Wiehland, 1999).

Der Begriff "Proteom" wurde im Jahre 1994 durch die Australier Marc Wilkins und Keith Williams geprägt. Abgeleitet wurde er aus den beiden Wörtern "PROTEin" und "genOME". Das Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt einer Zelle oder eines Organismus unter definierten Bedingungen exprimiert werden. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom nicht statisch, sondern verhält sich in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen extrem dynamisch und flexibel (Abb. 1.1).

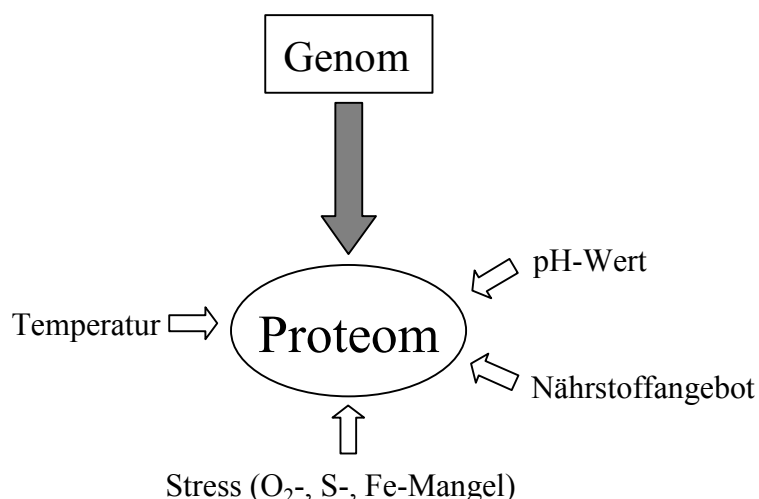


Abb. 1.1 Abhängigkeit der Proteinexpression von Umwelteinflüssen

Die Proteomanalyse stellt eine wichtige Ergänzung zur Genomanalyse dar, denn das komplexe Netzwerk der Zellregulation lässt sich nicht durch die Entschlüsselung genomischer DNA eines Organismus allein charakterisieren. Betrachtet man den biologischen Informationsfluss vom Gen zum funktionstüchtigen Protein, so wird dies deutlich. Komplexe Prozesse wie die Transkription der DNA-Sequenz, Translation der mRNA in Protein, Transport zum Wirkort, post-translationale Modifikation und Abbau des Proteins werden durchlaufen. Die Menge an Proteinen in der Zelle sowie die Modifikation eines Proteins kann nicht automatisch vom Gen oder der mRNA abgeleitet werden, sondern hierzu sind proteinspezifische Untersuchungen erforderlich. Die Proteomanalyse eröffnet somit die Möglichkeit der Identifizierung von Proteinen, der Charakterisierung post-translationaler Modifikationen und der Funktionsbeschreibung von Proteinen, Proteingruppen und ihrer Beziehung untereinander. Dieses wird heute mit Hilfe zweier Techniken erreicht. In der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese werden die Proteine getrennt, die Proteinidentifizierung und Charakterisierung geschieht über die massenspektrometrische Analyse. Die Massenspektrometrie erlaubt gegenüber der 2 D-Elektrophorese und deren Probenvorbereitung einen hohen Automatisierungsgrad. Die Möglichkeit der Automatisierung ebnete bereits den Erfolg in der Genomanalyse durch den effizienten Probendurchsatz, der die Sequenzdatenbanken und damit auch die Proteindatenbanken schnell anwachsen lässt, was die Proteinidentifikation über massenspektrometrische Analysen enorm erleichtert und beschleunigt. Der wachsende Aufbau von *in silico* Proteomdatenbanken (Pruess *et al.*, 2003) und experimentellen Proteomdatenbanken (Cordwell *et al.*, 1999) verbindet die Informationen von Proteinen aus 2 D-Referenzgelkarten mit Daten der Proteinidentifizierung (z. B. pI, MW, post-translationale Modifikation, Peptidmassenfingerprints), der Proteinlokalisierung (z. B. periplasmatisch, membrangebunden) und der

Expressionsänderung unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen (Cordwell *et al.*, 1999). Durch die Verbindung und den Vergleich insbesondere experimenteller Daten aus Genom-, Transkriptom- und Proteomanalysen wird somit ein ständig wachsender detaillierterer Einblick in das genetische, metabolische und physiologische Potential von Organismen gewonnen, der für die Anpassungsfähigkeit an bestimmte Lebensräume und der Reaktion auf Umweltveränderungen Aufschluss gibt.

Im Rahmen des Projektes "Sequenzierung und Funktionsanalyse des *P. putida* KT2440 Genoms" sollten in dieser Arbeit Gene und deren Genprodukte identifiziert und charakterisiert werden, die für das habitatspezifische Überleben eines ubiquitär vorkommenden Mikroorganismus wichtig sind. Für die Besiedlung der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen sind u. a. Gene wichtig, die an der Adhäsion von Samen- und Wurzeloberflächen beteiligt sind (de Weger *et al.*, 1995; Espinosa-Urgel *et al.*, 2000) und solcher die die Fähigkeit zur Nutzung von Samen- und Wurzelexudaten (Lugtenberg *et al.*, 1999) erlauben. Bereits die *in silico* Genomanalyse von *P. putida* KT2440 brachte ein breites Spektrum an Stoffwechselwegen und Transportern für aromatische Substrate hervor, die vorwiegend durch die Degradation von Pflanzenmaterial entstehen können (Nelson *et al.*, 2002). Weiterhin ist die Produktion und Nutzung mikrobieller Eisenchelatoren, insbesondere von Pyoverdinen wichtig, da die lebenswichtigen Eisenionen pflanzenpathogenen Mikroorganismen zum Wachstum entzogen werden, was einen Konkurrenzvorteil für die Besiedlung dieses Habitats, aber auch einen indirekten Pflanzenschutz vor pathogenen Befall darstellt (de Weger *et al.*, 1995).

Das methodische Vorgehen in der vorliegenden Arbeit gliederte sich in folgende Teilbereiche. Zunächst sollte der Aufbau einer Transposonmutantenbibliothek unter Verwendung eines neuartigen Transposonsystems (Goryshin und Reznikoff, 1998) erfolgen, das die schnelle Identifizierung des Transposonintegrationsortes im Genom über direkte DNA-Sequenzierung erlaubt. Dadurch wird der gleichzeitige Aufbau einer genotypisch charakterisierten willkürlich generierten Mutantenbibliothek ermöglicht, die für die Funktionsanalyse hilfreich ist. Die Identifizierung der für die Besiedlung der Rhizosphäre relevanten Gene erfolgt durch phänotypische und genotypische Analyse der Transposondefektmutanten sowie proteomanalytischen Methoden unter Verwendung der 2 D-Elektrophorese und massenspektrometrischen Untersuchungen mit dem Wildtyp.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevanter Geno ^a - oder Phänotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> Able K	<i>lac</i> (<i>LacZ</i> ⁻) [<i>Kan</i> ^r <i>McrA</i> ⁻ <i>McrCB</i> ⁻ <i>McrF</i> ⁻ <i>Mrr</i> ⁻ <i>hsdR</i> (<i>r_K</i> ⁻ <i>m_K</i> ⁻)] [<i>F'</i> <i>proAB lacI</i> ^q <i>ΔM15 Tn10</i>]	Stratagene, San Diego, USA
<i>E. coli</i> DH10B	<i>F</i> ⁻ , <i>mcrA</i> , (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>φ80dlacZM15</i> , <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , <i>Δ(ara, leu)7697</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>	Life Technologies GmbH, Eggenstein
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> (<i>φ80lacZΔM15</i>), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>F::Tn10</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>Δ(lacZ)M15</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>Nal</i> ^r), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_K</i> ⁻ <i>m_K</i> ⁻) <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> S17-1λpir	<i>Tp</i> ^r , <i>Sm</i> ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>tra</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺ , <i>IncP</i> , λpir lysogen	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas putida</i> DSM291 ^T		DSMZ ^b
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 DSM6125	<i>hsdR1</i> , <i>hsdM</i> ⁺ , <i>Ben</i> ⁺	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudomonas putida</i> DSM50198		DSMZ ^b
<i>Pseudomonas putida</i> DSM50208		DSMZ ^b
<i>Pseudomonas</i> sp. MT-1		Faude, 1995

^a Für Genotyp-Abkürzungen siehe Bachmann (1983)

^b Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

Tab. 2.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	relevantes Merkmal	Herkunft/Referenz
pBlueskriptSK ⁺ /KS ⁺	Klonierungsvektor, pUC19-Derivat, <i>lacZ</i> , <i>oriR</i> von ColE1, <i>Ap</i> ^r	Stratagene, San Diego, USA
pBlueskriptCKS ⁺	Klonierungsvektor, pUC19-Derivat, <i>lacZ</i> , <i>oriR</i> von ColE1, <i>Cm</i> ^r	Stratagene, San Diego, USA
pAG408	MiniTn5 -Transposonvektor zur Übertragung von <i>gfp42</i> ; <i>Ap</i> ^r , <i>Kan</i> ^r , <i>Gm</i> ^r	Suarez <i>et al.</i> , 1997
pDsRed	Expressionsvektor der das rote fluoreszierende Gen (DsRed) exprimiert, pUC19-Derivat, <i>Plac</i> , <i>oriR</i> von ColE1, <i>Ap</i> ^r	Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

2.2 Nährmedien und Zellanzucht

2.2.1 Komplexmedien

2.2.1.1 Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Bacto-Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

2.2.1.2 EM- Medium (LB-Medium, mod.)

Bacto-Trypton	20	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
Glucose	0,5	%
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

Die Glucose wurde als 10%-ige Stammlösung getrennt autoklaviert und in entsprechender Menge zugegeben.

2.2.1.3 SOB-Medium

Bacto-Trypton	2	%
Hefeextrakt	0,5	%
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
MgCl ₂	10	mM
MgSO ₄	10	mM
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

Die Magnesiumsalze wurden separat autoklaviert und anschließend mit den übrigen Komponenten vereinigt.

2.2.1.4 SOC-Medium

SOB-Medium mit 20 mM Glucose (Endkonzentration).

2.2.1.5 Caso-Medium

Pepton aus Casein	15	g
Pepton aus Sojamehl	5	g
NaCl	2,5	g
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

2.2.2 Mineralmedien

2.2.2.1 Minimalmedium zur Anzucht von *Pseudomonas putida* KT2440 (10-fach konzentriert)

Na ₂ HPO ₄	50	g
KH ₂ PO ₄	100	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g
CaCl ₂	0,01	g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01	g
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

Die Kalium- und Natriumsalze wurden separat gelöst und anschließend mit den anderen gelösten Salzen vereinigt. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

2.2.2.2 Low phosphat Medium (Neidhardt *et al.*, 1974, mod.)

MOPS	50	mM
KCl	50	mM
MgSO ₄	0,8	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,8	mM
KH ₂ PO ₄	0,3	mM
tri-Natriumcitrat x 2 H ₂ O	0,24	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	g
FeSO ₄ x 2 H ₂ O	1	g
H ₂ O _{dest}	ad 1000	ml

Zunächst wurde das MOPS eingewogen, in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Die Salze wurden gelöst und das Medium auf 1 l aufgefüllt. Die 1000- fach konzentrierte Eisenlösung wurde separat angesetzt und bei Bedarf zugegeben.

2.2.2.3 Nährlösung zur Anzucht von Getreidepflanzen (Hoagland und Arnon, 1950, mod.)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1	mM
KNO_3	1	mM
KH_2PO_4	0,5	mM
MgSO_4	0,5	mM
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	10	μM
FeSO_4	25	μM
MnCl_2	3	μM
H_3BO_3	2	μM
CuSO_4	1	μM
Na_2MoO_4	0,09	μM
ZnSO_4	4	μM
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	ad	1000 ml

Der pH-Wert wurde mit Salpetersäure (10 %) bzw. mit 2 M KOH auf pH 6 eingestellt.

Alle Nährmedien wurden zur Sterilisation für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Feste Nährmedien wurden durch Zusatz von 1,5 % Agar hergestellt.

2.2.3 Medienzusätze

Antibiotikastammlösungen und andere Zusätze wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Die wässrigen Stammlösungen wurden steriltriftriert, aliquotiert und bei -20 °C bis zu einem Jahr gelagert. Antibiotikahaltige Agarplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt und konnten bis zu vier Wochen nach ihrer Herstellung verwendet werden.

Tab. 2.3 Antibiotikastammlösungen sowie andere Zusätze

Zusatz	Lösungsmittel	Stamm- lösung	Endkonzentration im Medium
Na-Ampicillin	H ₂ O _{dest}	60 mg/ml	120 µg/ml
Gentamycin	H ₂ O _{dest}	10 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O _{dest}	30 mg/ml	60 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O _{dest}	60 mg/ml	120 µg/ml
X-Gal	N,N-Dimethylformamid	40 mg/ml	20-30 µl/Platte
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid	H ₂ O _{dest}	100 mM	100 µM

2.2.4 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen:

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 30 °C oder 37 °C, von Pseudomonaden bei 30 °C in sterilen Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsschüttler (150 bis 220 Upm). Hauptkulturen wurden mit 1 bis 2 % (v/v) einer logarithmisch wachsenden Vorkultur beimpft ($OD_{600} = 0,8$ bis 1,0).

Agarnährböden:

Alle *E. coli*-Stämme wurden bei 30 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert, die Pseudomonaden bei 30 °C.

2.2.5 Stammhaltung und Reinheitskontrolle

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden die Zellen in den entsprechenden Medien mit den entsprechenden Antibiotikalösungen bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert, 1000 µl der Bakterienlösung mit 500 µl sterilem 87 %-igen (v/v) Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert. Die Reinheit der Bakterienkulturen wurde durch mikroskopische Kontrolle (einheitliche Zellform) im Phasenkontrastmikroskop (Standard RA, Fa. Zeiss, Oberkochen), Ausstrich auf Komplexnährböden (homogene Koloniemorphologie) und Ausstrich auf Selektivnährböden (Nachweis der Resistenzen) überprüft.

2.2.6 Bestimmung der Bakteriendichte über die optische Dichte

Die optische Dichte (OD) von Bakterienkulturen wurde in 1 ml- Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen das entsprechende Medium als Referenz bestimmt. Proben mit hohen Zelldichten wurden mit dem Medium bis auf eine $OD_{600} = 0,6$ verdünnt, da nur in diesem Bereich eine lineare Beziehung zwischen Zellmasse und Extinktion besteht.

2.2.7 Nachweis der Cytochromoxidase

Der Nachweis der Cytochromoxidase wird zur schnellen Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien eingesetzt. Die Cytochromoxidase ist ein in der Natur weit verbreitetes Enzym der Eisenporphyrin-Gruppe, das das reduzierte Cytochrom c oxidiert und dabei selbst in die reduzierte, inaktive Form übergeht. Durch Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff geht die reduzierte Cytochromoxidase wieder in die oxidierte, aktive Form über. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff kann das Cytochromoxidase/Cytochrom c System eine Reihe von organischen Substanzen reduzieren; unter ihnen das sogenannte NaDi-Reagenz (1-Naphthol + Dimethylparaphenylendiamin), welches das Kondensationsprodukt Indophenolblau bildet. Zum Nachweis wurde eine auf einem Nährboden gewachsene Einzelkolonie von *Pseudomonas putida* KT2440 bzw. *E. coli* mit einer Impföse auf die Reaktionszone des Teststäbchens (Bactident[®] Oxidase, Merck KGaA, Darmstadt) verrieben. Bei Cytochromoxidase-positiven Keimen färbte sich die Reaktionszone blau (bei *P. putida* KT2440).

2.2.8 Zellernte

Die Zellernte erfolgte bei der jeweils erforderlichen Dichte der Kulturen. Diese wurden zunächst auf Eis abgekühlt und anschließend mit GS3- oder GSA-Rotoren in einer Sorvall RC-5C-Zentrifuge bei 3000 x g für 10 bis 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1 Pufferlösungen

Im folgenden sind die Zusammensetzungen aller Puffer aufgeführt, die im Text nicht näher erläutert werden. Zur Einstellung niedriger Pufferkonzentrationen wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt.

0,5 M EDTA (pH 8)

Na_2EDTA 46,5 g
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 1000 ml
 Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 10 M NaOH.

1 M Tris-HCl (pH 8)

Tris 121 g
 HCl konz. (37 %, w/v) 42 ml
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 1000 ml

PBS (pH7,3):

NaH_2PO_4 10 mM
 Na_2HPO_4 10 mM
 NaCl 138 mM

Na_2HPO_4 mit 770 ml vorlegen und den pH-Wert auf 7,3 mit NaH_2PO_4 einstellen.
 Das NaCl wird dazu gelöst.

50 x TAE-Puffer

Tris 242 ml
 Eisessig 57 ml
 EDTA (0,5 M; pH 8) 100 ml
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 1000 ml

1 x TE-Puffer

Tris-HCl (1 M, pH 8) 100 ml
 EDTA (0,5 M; pH 8) 10 ml
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 1000 ml

2.3.2 Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden autoklaviert, um Nukleasen zu inaktivieren. Hitzelabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gespült. Kleingegenstände aus Metall wurden vor dem Gebrauch mit Ethanol abgeflammt.

2.3.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Bakterienzellen

Chromosomale DNA wurde nach Stanley *et al.* (1987) in folgender Minipräparation aus bakteriellen Zellen isoliert:

Hierzu wurden 0,8 - 1,5 ml aus einer 5 ml ü/N Flüssigkultur abgenommen und für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter leichtem Schütteln nach Zugabe von 567 µl TE-Puffer (pH 8,0), 30 µl SDS (10 %, w/v) und 12 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 37 °C für 45 min. Zur Proteinfällung wurden 100 µl einer 5 M NaCl-Lösung zugegeben und sofort gemischt. Nach Zugabe von 80 µl einer 60 °C warmen CTAB/NaCl-Lösung (10 % CTAB; 0,7 M NaCl) wurde der Ansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert. Dabei wurden Zellwandreste, denaturierte Proteine und Polysaccharide an CTAB komplexiert, während die DNA in Lösung blieb. Es folgte eine Extraktion (mittlere und untere Phase) mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkoholgemisch (24:1; v/v), die so oft wiederholt wurde, bis kein Protein mehr an der Phasengrenze sichtbar war. Durch diesen Extraktionsschritt wurde der CTAB-Protein-Polysaccharid-Komplex entfernt. Nach dem letzten Extraktionsschritt wurde der Überstand sofort mit 0,6 Vol. Isopropanol überschichtet, wobei an der Phasengrenze DNA ausfiel. Nach 30-minütiger Zentrifugation (9000 x g, 4 °C) wurde die DNA zur Entfernung von Salzen mit Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und anschließend getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in einem geeigneten Volumen von Tris-Puffer oder H₂O_{dest} aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Zur Degradation der RNA wurde eine DNA-freie RNase aus Rinderpankreas (EC 3.1.27.5) als fertige Stammlösung (Tris-HCl, 10 mmol/l; CaCl₂ 5 mmol/l, Glycerin 50 % (v/v); pH 7,5; (Boehringer Mannheim GmbH) eingesetzt. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 100 µg/ml. Für einen Verdau wurde diese Stammlösung in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 90 min.

Alternativ wurde die chromosomale DNA mit Hilfe des "Qiagen Genomic DNA Kit" und des "MOBIO Kit" isoliert. Hierzu wurden 2 ml einer Übernachtskultur pelletiert (5000 x g, 10 min) und in 1 ml Puffer B1 resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 2 µl RNaseA-Lösung (100 mg/ml), 20 µl Lysozym (100 mg/ml) sowie 45 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 350 µl Puffer B2 und Inkubation bei 50 °C für 30 min erfolgte die Denaturierung der Proteine. Aus 400-500 µl Zellysat wurde mit dem "MOBIO Kit" die DNA isoliert, der Rest bei -20 °C gelagert. Das Lysat (400-500 µl) wurde mit 6 µl der resuspendierten "Binding Matrix" versetzt, gemischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach der Zentrifugation (10000 x g, RT, 1 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Durch wiederholtes Zentrifugieren wurde der Überstand gründlich entfernt, das verbliebene Pellet (an Matrix gebundene DNA) in 20 µl 10 mM Tris-Puffer resuspendiert und

zentrifugiert. Der die DNA enthaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß überführt.

2.3.4 Präparative Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus größeren Volumina wurde mit Hilfe des "Qiagen-Plasmid-Kit" (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde eine ü/N angezogene 1,5 ml-Kultur zentrifugiert (7000 x g, 4 °C, 15 min) und das Zellsediment in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2, mischen und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde 350 µl Puffer N3 hinzugegeben und sofort vorsichtig geschwenkt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (15000 x g, 4 °C, 10 min). Der klare Überstand wurde dann auf die QIAprep-Säule gegeben, diese mit 0,5 ml Puffer PB gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit der gebundene DNA nochmals mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mit 50 µl Elutions-Puffer.

2.3.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.3.5.1 Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Die zu extrahierende DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und intensiv gemischt. Zur Phasentrennung wurde zentrifugiert (10000 x g, RT, 15 min) und die obere, wässrige DNA enthaltene Phase in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

2.3.5.2 Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden in Gegenwart von 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) durch die Zugabe von 3 Vol. eiskaltem Ethanol (96%, v/v) bzw. 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (Sambrook *et al.*, 1989). Die aus der Lösung präzipitierte DNA konnte nach 30-minütiger Inkubation bei -20 °C oder auch durch sofortige Zentrifugation (10000 x g, 4 °C, 30 min) gefällt werden. Die pelletierte DNA wurde mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %, v/v) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Germany) getrocknet und in einem gewünschten Volumen Tris-Puffer bzw. H₂O_{dest} resuspendiert.

2.3.5.3 Mikrodialyse von DNA

Zur Entfernung von Salzen wurden DNA-Lösungen geringen Volumens (bis 80 µl) einer sogenannten Mikrodialyse unterzogen (Marusyk und Sergeant, 1980). Dafür wurde die DNA-Lösung vorsichtig auf einen Membranfilter (Millipore Membranfilter, Porengröße 0,025 µm, Millipore GmbH, Eschborn) pipettiert, welcher auf der Oberfläche der gewünschten Dialyselösung schwamm. Nach 10 bis 30 min war die Dialyse abgeschlossen, und die DNA-Lösung konnte vorsichtig mit einer Pipette wieder abgenommen werden. Die dialysierten DNA-Lösungen wurden zur Ligation und Elektroporation eingesetzt.

2.3.6 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA wurde in entsprechenden Verdünnungen photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen TE-Puffer bzw. gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ in Quarzglasküvetten durchgeführt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm gilt für gereinigte DNA: $\text{OD}_{260} = 1$ entspricht 50 µg ds-DNA pro ml (Davis *et al.*, 1980).

Verunreinigungen wie z. B. durch Proteine konnten gleichfalls durch photometrische Messung nachgewiesen werden. Proteinfreie DNA-Lösungen sollten ein Verhältnis der OD_{260} zu OD_{280} von 1,8 bis 2,0 aufweisen (Sambrook *et al.*, 1989).

Alternativ konnte die Konzentration der DNA auch nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung durch visuellen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit DNA-Standards bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

2.3.7 Größenauftrennung von DNA und DNA-Fragmenten

2.3.7.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten sowie zur Qualitätskontrolle von Restriktionsspaltungen wurden Agarosegelelektrophoresen in horizontalen Elektrophoresekammern der Firma GIBCO BRL durchgeführt.

Die Agarosekonzentrationen variierten dabei zwischen 0,8 und 1,5 % (w/v) in 1 x TAE-Puffer in Abhängigkeit von Art und Größe der Nukleinsäuren

(Sambrook *et al.*, 1989). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. "Stopp-Mix" versehen, um sie zu beschweren und die Lauffront zu markieren. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x TAE-Puffer. Die angelegte, konstante Spannung betrug in der Regel zwischen 25 und 100 Volt, woraus sich je nach Gelgröße eine Laufzeit von 1 bis 15 h ergab.

"Stopp-Mix" (6 x konz.)

Bromphenolblau	125	mg
Xylencyanol FF	125	mg
Glycerin (87 % (w/v))	17	ml
H ₂ O _{dest}	ad	50 ml

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Nukleinsäuren im Agarosegel in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung ($c_{\text{EtBr}} = 1 \mu\text{g/ml}$) 15 bis 20 min gefärbt. Anschließend wurde das Gel 10 min im Wasserbad entfärbt und auf einem UV Transilluminator (Herolab, Modell UVP) bei 312 nm mit einer CCD Kamera (Herolab, Modell 429 K) fotografiert. Zur Dokumentation wurden Fotos mit Hilfe eines Videoprinters (Mitsubishi Video Copy Processor) angefertigt.

2.3.7.2 DNA-Längenstandards

Zur Größenbestimmung von linearen DNA-Fragmente wurden verschiedene Längenmarker verwendet.

- 1 kb DNA Ladder von GIBCO (Life Technologies, Eggenstein) [bp]: 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1600, 1000 und 500.
- 1 kb plus DNA Ladder von Invitrogen (Life Technologies, Eggenstein) [bp]: 12000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200 und 100.
- λ HindIII/ Marker 2 von MBI Fermentas [kb]: 23,12; 9,42; 6,56; 4,36; 2,32; 2,03, 0,56 und 0,13.

2.4 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das sequenzspezifische Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in Kombination mit den vom Hersteller als 10-fache Stammlösungen mitgelieferten Puffersystemen. Die Spaltungsreaktionen wurden in einem Volumen von mindestens 10 µl pro µg DNA und einem maximalen Gesamtvolumen von 100 µl bei 37 °C für 2 bis 16 h durchgeführt. Bei Mehrfach-Restriktionen, die nicht im gleichen Puffersystem durchgeführt werden konnten, wurde zunächst ein Einfachverdau des Enzyms in dem Puffer mit geringerer Ionenstärke durchgeführt, welche dann für das nachfolgende Enzym erhöht wurde.

Der Erfolg der Spaltungsreaktionen wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Sollte die DNA zur Klonierung eingesetzt werden, wurde die erste Restriktionsendonuklease zunächst durch eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion abgetrennt und die DNA anschließend aus der wässrigen Phase gefällt, wobei alternativ auch eine Hitzeinaktivierung (nach Angaben des Herstellers) erfolgen konnte.

2.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Rezirkularisierung linearisierter Vektor-DNA infolge einer Selbstligation konnte durch Dephosphorylierung des 5'-Endes vermieden werden. Die Abspaltung des Phosphatrestes wurde direkt im Restriktionsansatz durchgeführt.

Nach vollständiger Linearisierung des Vektors wurden dem Restriktionsansatz 0,1 Vol. des zehnfach konzentrierten Enzym-Reaktionspuffers sowie 0,5 bis 1 U alkalische Shrimps-Phosphatase pro µg DNA zugesetzt und die Inkubation bei 37 °C für 20 min fortgesetzt. Das Enzym konnte durch eine 15-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert werden. Die DNA wurde danach mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

2.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligierungsreaktion linearisierter Vektor-DNA beruht auf einer Bildung von Phosphordiesterbindungen zwischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten, von denen

mindestens ein Strang ein 3'-OH- und ein 5'-Phosphat-Ende aufweisen muss, ferner ist die Anwesenheit von ATP erforderlich. Der Erfolg einer Ligation ist unter anderem abhängig von Länge und Konzentration der Vektor- und des inserierten DNA-Fragments (Dugaizyk *et al.*, 1975). Niedrige DNA-Konzentrationen und kleine Fragmentgrößen begünstigen die intramolekulare (bimolekulare) Ligation (Oligomerisierung) der Fragmente. Im Regelfall wurde das zu ligierende Fragment im Überschuss eingesetzt. Eine intramolekulare Selbstligation des Vektors konnte durch vorherige Dephosphorylierung (s. 2.4.2) verhindert werden.

Die Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl mit jeweils 0,2 bis 2 µg Vektor- und Insert-DNA durchgeführt. Zum gereinigten Reaktionsansatz wurden 0,1 Vol. eines zehnfach konzentrierten, ATP-haltigen Ligationspuffers und 1 U T4-DNA-Ligase zugegeben (New England Biolabs). Es wurde für 12 bis 15 h bei 16 °C inkubiert.

Vor einer Elektroporation mussten die Ansätze einer Mikrodialyse (s. 2.3.5.3) unterzogen werden, für eine Transformation konnten sie dagegen direkt verwendet werden.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine automatisierte *in vitro* Methode, die eine gezielte Vermehrung bestimmter DNA-Bereiche des Ausgangsmaterials durch den Einsatz von Oligonukleotiden als Startmoleküle (Primer) für eine DNA-Polymerase ermöglicht (Saiki *et al.*, 1985). Die PCR wurde von Mullis (Mullis und Faloona, 1987) für die *in vitro* Anwendung optimiert und 1993 mit dem Nobelpreis gewürdigt, da sie einen methodischen Meilenstein auf dem Gebiet der Molekularbiologie darstellt.

Der Standard-PCR Ansatz sah folgendermaßen aus:

DNA-Lösung	1	µl		
H ₂ O _{dest}	28,7	µl		
Inkubationspuffer [10 x]	5	µl		
dNTPs [5 mM]	10	µl	Endkonz.	[0,25 mM]
Primerstammlösung [10 µM]	2,5	µl	Endkonz.	[0,5 µM]
Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,2	µl	Endkonz.	[1 U]
Gesamtvolumen	50	µl		

Bei GC-reichen Templates wurde die 5-fach konzentrierte Q-Solution (Qiagen GmbH, Hilden) mit in die Reaktion eingesetzt.

Die Konzentration der DNA-Lösung variierte je nach Reaktion. Wichtig war, dass beim Ansetzen der Lösung die Template-DNA nicht in TE-Puffer, sondern in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen wird, da TE-Puffer EDTA enthält, das als Chelatbildner die Magnesiumkonzentration im Ansatz verringern würde.

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem programmierten Thermocycler (Eppendorf Mastercycler gradient), wobei folgendes Basisprogramm verwendet wurde:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	94 °C	2 min	Initiale Denaturierung
2	94 °C	30 s	Denaturierung
2	40 - 60 °C	30-60 s	Primeranlagerung (Annealing)
2	72 °C	1-3 min	Elongation
3	72 °C	10 min	abschließende Auffüllreaktion (Extension)
4	4 °C	konstant	

Der Zyklus 2 wurde 20-30-mal wiederholt. Die Annealing- und die Elongationszeit richteten sich nach Länge und Zusammensetzung der Primer bzw. nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Dabei wurde die Annealingtemperatur (T_{ann}) so gewählt, dass sie ca. 5 °C unter dem Schmelzpunkt (T_{m}) der Primer lag. Die Länge der Primer sollte zwischen 20 und 30 Nukleotiden liegen. Die Schmelztemperatur der Primer-Paare sollte möglichst ähnlich sein, damit gewährleistet ist, dass die Primer-Template-Hybride im gleichen Temperaturbereich stabil sind. Die Schmelztemperaturen (T_{m} -Wert) konnten nach folgender Faustformel abgeschätzt werden:

$$Tm = [n(G + C) \times 4^\circ\text{C} + n(A + T) \times 2^\circ\text{C}]$$

Weiterhin wurde bei einigen der für diese Arbeit hergestellten Primern die Tatsache genutzt, dass das PCR-Produkt an seinen beiden Enden durch die 5'-Enden der verwendeten Primer definiert ist, so dass durch Anhängen verschiedener Restriktionsschnittstellen an den beiden 5'-Enden der Primer gerichtete Insertion in einen Klonierungsvektor ermöglicht wird. Durch bestimmte flankierende Nukleotide an den Erkennungsstellen kann die Effizienz der Spaltung signifikant erhöht werden (New England Biolabs Katalog, 2000). Die kompletten Primersequenzen einschließlich der hinzugefügten Sequenzen mit den Restriktionsschnittstellen sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Tab. 2.4: Primer zur Amplifikation und Sequenzierung

Primer	Primersequenz 5' → 3'	T _{ann} (°C)
pDSRed For AseI	GCG <u>ATT AAT</u> GAG GTC TTC CAA GAA TG	45
pDSRed Rev BamHI	CGG <u>GAT CCC</u> TAA AGG AAC AGA TGG	41
APHA For BamHI	CGG <u>GAT CCC</u> GGC TCC GTC GAT ACT ATG T	57
APHA Rev BamHI	CGG <u>GAT CCC</u> CTT TTT AGA CAT CTA AAT CTA G	55
APHA For AseI	AGG <u>CGC GCC</u> CGG CTC CGT CGA TAC TAT GT	57
APHA Rev EcoRI	GGA <u>ATT CCG</u> CTT TTT AGA CAT CTA AAT C	51
Kan-2 For	CTC AAA ATC TCT GAT GTT ACA TTG C	63
Kan-2 Rev	GGT TGA TGA GAG CTT TGT TGT AGG T	67
ARB-1	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN NNN GAT AT	73
ARB-2	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	61
Kan-2 RP1	GCA ATG TAA CAT CAG AGA TTT TGA G	63
Kan-2 FP1	ACC TAC AAC AAA GCT CTC ATC AAC C	67
TnInt For	GCT TCA GGG TTG AGA TGT GTA TA	61
TnInt Rev	GAG ACA CAA TTC ATC GAT GGT TAG TG	69
BOXA1R	CTA CGG CAA GGC CGA CGC TGA CG	73
M13 (-21)	GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA G	63
rM13 (-24)	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TG	63

Für die Elongationszeit galt die Faustformel: 60 s Elongationszeit je 1000 bp Fragmentlänge. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurde ein kleines Volumen (ca. 2-5 µl) von jedem Ansatz zur Überprüfung der Reaktion zur Gelelektrophorese auf ein Agarosegel aufgetragen.

War eine besondere Reinheit des PCR-Produktes erforderlich (z. B. bei Verwendung des Produktes für eine Ligation), so wurde der Ansatz mit dem "QIAquick- spin PCR Purification Kit" (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Aufreinigung von PCR-Proben, in denen die PCR-Reaktion in 96 Kavität-PCR-Platten (Thermo-Fast® 96 PCR plate, Peqlab; Erlangen) durchgeführt wurde und für eine nachfolgende Sequenzierung (s. 2.9) eingesetzt werden sollte, wurden "Multi-Screen PCR plates" (Millipore, Eschborn) verwendet und die Proben nach Angaben des Herstellers mit Hilfe eines Vakuumfiltrationssystem aufgereinigt.

Um die Effizienz von "blunt-end" Klonierungen eines PCR-Produktes zu erhöhen, wurde das PCR-Produkt in eine DNA-Polymerase-Reaktion mit *Pfu* Polymerase (Stratagene) eingesetzt. In dieser Reaktion werden durch die 3'⇒5'Exonukleaseaktivität der *Pfu* Polymerase mit hoher Effizienz 3' überhängende Enden aufgefüllt ("Polishing").

Standardreaktionsansatz:

PCR-Produkt (10-500 ng)	7	µl
cloned <i>Pfu</i> Polymerase-Puffer	0,2	µl
dNTP- Mix [1,25 mM]	2	µl
<i>Pfu</i> Polymerase (2,5 U/µl)	1	µl
H ₂ O _{dest} ad	10	µl

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 72 °C. Vor dem Einsatz des PCR-Produktes in einen Ligationsansatz wurde es gegen H₂O_{dest} dialysiert (s. 2.3.5.3).

2.5.1 Arbitrary PCR zur Identifizierung der transposonflankierenden DNA-Sequenz

Zur genotypischen Analyse der *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten (s. 2.7) wurde zur Bestimmung des Transposonintegrationsortes die transposonflankierende DNA-Sequenz über Arbitrary ("zufällige") PCR amplifiziert (Caetano-Annoles, 1993; O'Toole und Kolter, 1998 a). Hierzu wurde in zwei PCR-Amplifikationen die DNA-Sequenz, die den Insertionsort des Transposons flankiert, angereichert. Dies wurde erreicht durch den Einsatz von spezifischen Primern, die an den Enden des Tn5-Transposons binden (Kan-2 RP1 und TnINT Rev) sowie von sogenannten "Arbitrary Primern" (ARB-1 und ARB-2), die an Nukleotidsequenzen im Genom, die das Transposon flankieren, binden.

In der ersten PCR- Amplifikation diente als Primerpaar der Kan-2RP1 Primer dessen Sequenz identisch zum Ende des Tn5-Elements ist und der unspezifische Primer ARB-1 (s. Tab. 2.4), als DNA-Template wurde 1 µl des Überstands aus einer lysierten *P. putida* KT2440-Kolonie eingesetzt . Folgende Reaktionsbedingungen galten:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	95 °C	300 s	Denaturierung
2	30 °C	30 s	Primeranlagerung
2	72 °C	90 s	Elongation
3	95 °C	30 s	Denaturierung
3	45 °C	30 s	Primeranlagerung
3	72 °C	120 s	Elongation

Der Zyklus 1 wurde einmal durchgeführt und die Zyklen 2 und 3 30-mal wiederholt.

In der zweiten PCR-Amplifikation wurden 5 µl des ersten PCR-Produkts als DNA-Template eingesetzt, als PCR-Primer dienten ARB-2 sowie TnINT Rev. Die ARB-2

Sequenz ist identisch zum 5'-Ende des ARB-1 Primers und die Sequenz des TnINT Rev Primers ist identisch zum äußersten Ende des Tn5-Elements. Die Reaktionsbedingungen für den zweiten PCR-Schritt waren:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	95 °C	30 s	Denaturierung
1	45 °C	30 s	Primeranlagerung
1	72 °C	120 s	Elongation

Der Zyklus 1 wurde 30-mal wiederholt.

Die PCR-Produkte wurden gereinigt (s. 2.5), sequenziert (TnINT Rev als Sequenzierprimer) und die erhaltenen DNA-Sequenzen mit der Nukleinsäuresequenz des *P. putida* KT2440-Genoms verglichen.

2.5.2 Genomische Fingerprintanalyse mittels repetitiver Polymeraseketten Reaktion (rep-PCR)

Zur Reinheitsüberprüfung von *Pseudomonas putida* KT2440-Zellen wurde neben der makroskopischen und mikroskopischen Überprüfung noch eine molekularbiologische Methode für die Stammidentifizierung eingesetzt.

Bei dieser PCR-Methode werden Primer verwendet, die an sich wiederholende DNA-Elemente im Genom binden. Mittels PCR-Amplifikation erfolgt die Bildung spezifischer reproduzierbarer genetischer Fingerprints. Zu den repetitiven Elementen gehört auch das 154 Basenpaar große BOX Element (Versalovic *et al.*, 1994), das für die vorliegende Fingerprintanalyse genutzt wurde. Da die repetitiven Elemente in beiden Orientierungen im Genom vorliegen, genügt ein Primer, der am äußeren Ende der boxA-Untereinheit des BOX-Elements bindet, um distinkte Bereiche genomischer DNA zwischen den BOX-Elementen zu amplifizieren (Versalovic *et al.*, 1994). Nach Auftrennung der amplifizierten Fragmente im Agarosegel (1,5 % NuSieve Agarose/TAE) entsteht ein genomischer Fingerabdruck. Vorteil dieser Methode ist die Differenzierung der Bakterien auf Stammebene. So wurden *P. putida*-Kontaminationen mit einem geringen Zeitaufwand (ca. 8 Stunden) erkannt (Rademaker *et al.*, 1998).

Der Standard-PCR-Ansatz für die repetitive PCR sah folgendermaßen aus:

DNA-Lösung	1	µl		
H ₂ O _{des}	7,75	µl		
Inkubationspuffer [10 x]	2,5	µl		
dNTPs [5 mM]	6,25	µl	Endkonz.	[1,25 mM]
BoxA1R-Primer [100 mM]	0,5	µl	Endkonz.	[2 mM]
MgCl ₂ [25 mM]	2	µl	Endkonz.	[2 mM]
Q-Solution [5 x]	5	µl		
Taq DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,2	µl	Endkonz.	[1 U]
Gesamtvolumen	25	µl		

Die Durchführung der PCR erfolgte in einem programmierten Thermocycler (Eppendorf Mastercycler gradient), wobei folgendes Programm verwendet wurde. Die Zyklen 1, 3 und 4 wurden einmal durchgeführt, der Zyklus 2 30-mal wiederholt:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	94 °C	7 min	Initiale Denaturierung
2	94 °C	1 min	Denaturierung
2	50 °C	1 min	Primeranlagerung (Annealing)
2	65 °C	8 min	Elongation
3	65 °C	16 min	abschließende Auffüllreaktion (Extension)
4	16 °C	konstant	

2.6 DNA-Transfer in Bakterien und Selektion rekombinanter Klone

2.6.1 Übertragung von Plasmid-DNA aus einem konjugationsfähigen *E. coli*-Stamm als Donor auf den Rezipientenstamm *P. putida* KT2440

Als Donorstamm diente *E. coli* S17-1λpir, der den auf *P. putida* KT2440 zu übertragenden mini-Tn5-Transposonvektor pAG408 enthielt (Suarez *et al.*, 1997). Die Übertragung erfolgte über das sogenannte "Filter-Mating". Der Donor- sowie der Rezipientenstamm wurden jeweils bis zur Mitte der logarithmischen Phase bei 37 °C bzw. 30 °C in 5 ml EM-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Je 1 ml der Donor- und Rezipientenzellen wurden dreimal in 1 ml EM-Medium gewaschen, um die Kulturen von den Antibiotika zu befreien, und im gleichen Verhältnis in 40 µl EM-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf

Nucleopore-Membranen (Millipore HAW PO2500) getropft und auf EM-Platten ü/N bei 30 °C inkubiert. Das Zellmaterial auf dem Filter wurde vorsichtig mit einer Impföse direkt in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 1 ml EM-Medium gegeben, resuspendiert und auf Selektivplatten ausgestrichen. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Minimalplatten in Anwesenheit der vom Plasmid kodierten Antibiotika Ampicillin, Gentamycin und Kanamycin. Zur Aufreinigung der Transkonjuganten wurden Einzelkolonien gepickt, auf Selektivplatten gestrichen und nach Koloniewachstum nochmals überimpft. Als Kontrolle wurden Donor- und Rezipientenzellen auf den Selektivplatten für die Transkonjuganten getestet.

2.6.2 Elektroporation in *E. coli*

Durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) kann DNA im Vergleich zur Transformation mit höherer Effizienz übertragen werden. Um den gewünschten *E. coli*-Stamm für die Elektroporation vorzubereiten, wurde er in 250 ml LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 angezogen und anschließend für 15 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden zentrifugiert (4000 × g, 4 °C) und zweimal mit jeweils einem Volumen kaltem H₂O_{dest.} gewaschen. Die Waschschrte mussten schnell durchgeführt werden, um ein Lysieren der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 10 ml 10 %-igem Glycerin (v/v, kalt) gewaschen und in 0,5 bis 1 ml 10 %-igem Glycerin (v/v, kalt) aufgenommen. Diese Zellsuspension konnte direkt zur Elektroporation eingesetzt oder in kleineren Aliquots bei -70 °C eingefroren werden. Eingefrorene Zellen wurden vor der Elektroporation langsam auf Eis aufgetaut. Alternativ dazu wurden kommerziell erworbene Zellen zur Elektroporation eingesetzt; hier wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Die Elektroporation erfolgte in einem "Gene Pulser" (Fa. BIO-RAD Laboratories, München). Je 20-40 µl der vorbereiteten *E. coli*-Empfängerzellen wurden in einer auf Eis gekühlten Elektroporationsküvette mit 1-2 µl DNA-Lösung versetzt. Ligationsansätze wurden vor der Elektroporation mikrodialysiert (s. 2.3.5.3) und insgesamt in den Elektroporationsansatz eingesetzt. Für den Puls wurden folgende Bedingungen am Gerät vorgegeben:

Kapazität	25	µF		
Spannung	1,7	kV	0,1 cm	Küvette
	2,5	kV	0,2 cm	Küvette
Widerstand	200	Ω		

Die sich ergebenden Zeitkonstanten lagen zwischen 4 und 5 ms. Direkt nach dem Puls wurde die Zellsuspension mit 1 ml LB-Medium oder SOC-Medium vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden auf den entsprechenden Agarplatten mit den jeweils erforderlichen Antibiotika ausplattiert.

2.6.3 Elektroporation in *P. putida* KT2440

Um den *P. putida* KT2440-Stamm für die Elektroporation vorzubereiten, wurde er in 50 ml EM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 angezogen und anschließend für 15 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden zentrifugiert (4000 × g, 4 °C) und zweimal mit jeweils einem Volumen kaltem H₂O_{dest} gewaschen. Die Waschschrte mussten schnell durchgeführt werden, um ein Lysieren der Zellen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen einmal in 2,5 ml 0,3 M kalter Sucroslösung gewaschen und in 0,5 bis 1 ml 0,3 M kalter Sucroslösung aufgenommen. Diese Zellsuspension konnte direkt zur Elektroporation eingesetzt oder in kleineren Aliquots (50 µl) bei -70 °C eingefroren werden. Eingefrorene Zellen wurden vor der Elektroporation langsam auf Eis aufgetaut. Die Elektroporation erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben.

Die *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten wurden nach der Elektroporation mit dem EZ::TNTM <Kan-2> Tnp TransposomeTM (s. 2.7; Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, USA) nach zweistündiger Inkubation in SOC-Medium bei 30 °C auf EM-Kanamycin-Medium selektiert. Zur Konservierung wurden die Kolonien in Mikrotiterplatten ebenfalls in EM-Medium mit Kanamycin als Glycerolkultur bei -70 °C gelagert.

2.6.4 Der X-Gal-Test zur Selektion rekombinanter Klone

Bei Klonierungen ist es entscheidend, Klone, die nach Übertragung von DNA nur den Vektor enthalten, von denjenigen, die einen Vektor mit Insert tragen, zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde ein zusätzliches Screeningsystem neben der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz genutzt. Plasmide der pBlueskript-Reihe enthalten neben dem Promotor- und Operator-Bereich des *lac*-Operons auch das 5'-Ende des *lacZ*-Gens (Viera und Messing, 1982). Dieses kodiert für das sogenannte α-Peptid, welches die inaktive β-Galaktosidase von Wirtstämmen wie *E. coli* DH10B oder DH5α komplementieren kann. Da sich die multiple Klonierungsstelle der verwendeten Vektoren innerhalb des aminoterminalen Bereichs des *lacZ*-Gens befindet, ist eine α-

Komplementation nur möglich, wenn das Plasmid kein Insert besitzt. Der Nachweis der aktiven β -Galaktosidase auf Agarplatten erfolgt durch Zugabe des Induktors IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid) und des Substrats X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoyl- β -D-galaktosid), welches durch das Enzym gespalten wird. Dabei entsteht in Anwesenheit von Sauerstoff der blaue Farbstoff 5-Brom-4-chlor-indigo (Horowitz *et al.*, 1964), welcher der Indikator für rekombinante *E. coli*-Stämme ist, die ein Plasmid ohne Insert tragen.

2.7 Transposonmutagenese in *P. putida* KT2440

Zur Transposonmutagenese in *P. putida* KT2440 wurde das von Goryshin und Reznikoff entwickelte Transposomesystem, ein *in vitro* Transpositionssystem für Tn5 eingesetzt (Goryshin und Reznikoff, 1998; <http://www.epicentre.com/transposomics.htm>). Die Reaktion einer hyperaktiven Tn5-Transposase und einem Tn5-Transposon führt in Abwesenheit von Magnesiumionen zur Bildung eines synaptischen Komplex, der als EZ::TNTM TransposomeTM bezeichnet wird. Dieses stabile EZ::TNTM <Kan-2> Tnp TransposomeTM (Epicentre Technologies, Madison, Wisconsin, USA) gelangt durch einfache Elektroporation in die Wirtszellen (s. 2.6.3). Durch die in den Wirtszellen vorhandenen Magnesiumionen katalysiert die hyperaktive Tn5-Transposase die Integration des Tn5-Transposons in das Bakteriengenom (Abb. 2.1). Die *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten wurden auf EM-Kanamycin-Medium selektiert und auf verschiedene Eigenschaften untersucht.

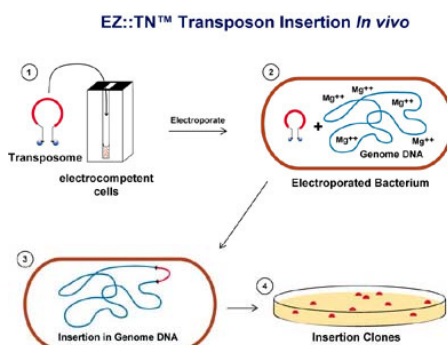


Abb. 2.1 EZ::TNTMTransposomeTM vermittelte Insertion in ein Bakteriengenom
(s. <http://www.epicentre.com/transposomics.htm>)

2.8 Screening der *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten

2.8.1 Screening auf Auxotrophie

Das Screening nach auxotrophen *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten erfolgte auf Minimalmedium mit 20 mM Acetat als Kohlenstoffquelle. Hierfür wurden die konservierten *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten parallel auf Minimalmedium mit Acetat und EM-Vollmedium gestempelt und das Wachstum nach 2-tägiger Inkubation bei 30 °C verglichen. Die potentiell auxotrophen Mutanten wurden erneut überprüft und als Glycerolkultur konserviert.

2.8.2 Screening auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung

Die Fähigkeit von Zellen, sich an Oberflächen anzuheften, wird als Bildung von Biofilmen bezeichnet. Zur Untersuchung von *P. putida* KT2440 und den generierten Mutanten sich an abiotische Oberflächen anzuheften und nachfolgend einen Biofilm zu bilden, wurde das von O'Toole und Kolter entwickelte System modifiziert angewendet (O'Toole und Kolter, 1998 a).

Hierzu wurden in die Vertiefungen einer 96-Kavität Mikrotiterplatte (Mikrotiterplatten aus Polystyrol, No. 92696, TPP, Schweiz) je 100 µl Minimalmedium mit 10 mM Glucose als Kohlenstoffquelle pipettiert. Jede Kavität wurde mit 2,5 µl einer ü/N in Vollmedium gewachsenen *P. putida* KT2440-Kultur beimpft und für verschieden lange Zeiträume (4 bis 16 h) bei 30 °C stehend inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden jeweils 20 µl einer Kristallviolettlösung (1 % Kristallviolett in 96 % Ethanol) hinzugefügt und bei Raumtemperatur für weitere 15 min stehend inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde vorsichtig 10 mal mit Wasser gewaschen und über Papier für 20 min getrocknet. Die Bildung eines Biofilms ließ sich an einem blaugefärbten, wasserunlöslichen Komplex (Grenzfläche zwischen Luft und Medium) erkennen. Zur Quantifizierung wurden 200 µl 96 %-iges technisches Ethanol in jede Kavität pipettiert und für 10 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der in Alkohol lösliche blaue Komplex in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 650 nm gegen Medium als Referenz quantifiziert. Veränderungen in der Biofilmbildung der Mutanten wurden im Vergleich zu der Biofilmbildung der Wildtypkultur ermittelt.

2.8.3 Screening auf Siderophorbildung unter eisenlimitierten Bedingungen

Dieses Screening beruht auf der Fähigkeit von Pseudomonaden unter Eisenmangel Siderophore (mikrobielle Eisenchelatoren) zu produzieren. Zu diesen gehören die ins Medium ausgeschiedenen Pyoverdine, Chromopeptide, die aus einer Peptidkette von sechs bis zwölf Aminosäuren und einem Chromophor (Diamino-dihydroxychinolin) bestehen. Sie fluoreszieren unter UV Licht und können dadurch leicht sichtbar gemacht werden.

In Mikrotiterplatten pipettiertes Low Phosphat Medium (200 µl/Kavität) mit 10 mM Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde mit Eisenionen komplementiert oder nicht (+/- 36 µM FeSO₄). Diese Medien wurden mit Übernachtskulturen (in Minimalmedium mit Glucose gewachsen) der Mutanten und des Wildtyps inokuliert (1:20) und bei 30 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert und 100 µl des zellfreien Überstandes in neue Mikrotiterplatten transferiert. Die Fluoreszenz unter UV-Licht wurde sowohl im zellfreiem Überstand als auch in den Zellen im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Auffällige Mutanten, die unter eisenlimitierten Bedingungen nicht oder nur abgeschwächt fluoreszierten, wurden weiter charakterisiert.

2.8.4 Screening auf oxidativen Stress

Toxische Sauerstoffderivate, wie Superoxid, Wasserstoffperoxid sowie Hydroxylradikale lösen in Bakterienzellen oxidativen Stress aus. Die Bakterien schützen sich vor diesem oxidativen Stress, indem sie z. B. Enzyme wie die Katalase und die Superoxiddismutase exprimieren, die die toxischen Sauerstoffprodukte in nicht-toxische umwandeln.

In diesem Screening sollten Mutanten gefunden werden, die im Vergleich zum Wildtyp auf oxidativen Stress mit verändertem Wachstum reagierten. Hierzu wurde in einen Standzylinder 50 ml einer 1 M Wasserstoffperoxidlösung (Gemisch: 45 ml H₂O mit 5 ml 35 % H₂O₂-Lösung (= 10 M)) und 50 ml abgekühlter LB-Agar gegeben, gemischt und 50 ml dieser Mischung in zwei Petrischalen überführt. Zum verbliebenen Rest wurden erneut 50 ml LB-Agar gegeben und die Prozedur wiederholt. Auf diese Weise erhielt man LB-Platten mit H₂O₂-Konzentrationen von 0,5 M bis 2 mM. Als

Negativkontrolle dienten LB-Platten ohne Wasserstoffperoxid. Für das Screening wurde jeweils 10 µl einer Übernachtskultur (in Vollmedium gewachsen) auf die Agarplatten pipettiert und bei 30 °C für 16 Stunden inkubiert. Die Ansätze wurden in Doppelbestimmungen im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

2.8.5 Screening auf die geißelgesteuerte Bewegung

Ausgewählte Mutanten wurden auf ihre Beweglichkeit auf 0,3 %-igem Agar im Vergleich zum Wildtyp getestet. Es wurden 0,3 % LB-Platten vorbereitet und über Nacht getrocknet. Frisch ausgestrichene Einzelkolonien der Mutanten und des Wildtyps wurden mit einem Zahnstocher auf die Platte punktiert inokuliert und bei Raumtemperatur für 20 Stunden inkubiert. Die Ansätze wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die geißelgesteuerte Bewegung der Mutanten wurde mit der des beweglichen Wildtyps verglichen.

2.9 Sequenzierung am ABI PRISM™ 377 und ABI PRISM™ 3100 Genetic analyser

Bei der hier durchgeführten Sequenzierung handelt es sich um eine an die Desoxyabbruchmethode angelehnte Sequenzreaktion (Sanger *et al.*, 1977), wobei hier im Gegensatz zu bisher verwendeten nicht-radioaktiven Sequenzierungsmethoden (A.L.F.) zur Detektion der Abbruchfragmente fluoreszinmarkierte Terminatoren (ddNTP) eingesetzt werden. Diese bestehen aus einem Donor (6-Carboxyfluoreszin), der die Energie, die von einem Argonlaser der ABI PRISM Sequenziereinheit ausgesendet wird, aufnehmen und an einen Akzeptor mit 100 %-iger Effizienz weiterleiten kann. Dieser im gleichen Molekül befindliche Akzeptor emittiert dann das für das jeweilige Abbruchfragment spezifische Licht, welches von einem Photosensor aufgezeichnet wird.

Die Reaktion wurde mit 200-500 ng dsDNA in üblichen Sequenzierungsvektoren (pBlueskript, pUC18, etc.), die über Anionenaustauschchromatographie gereinigt wurden, in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Es wurden 10 pmol Primer, 6 µl des "Big Dye Terminator™ v. 2.0 Ready Reaction Mix" (enthält die Terminatoren, Desoxynukleotidtriphosphate, Magnesiumchlorid und die *AmpliTaq*® DNA Polymerase FS) zugesetzt. Die eigentliche Reaktion lief in mehreren Zyklen in einem Thermoblock (Eppendorf Mastercycler gradient) ab. Sie hielt sich, da dsDNA sequenziert wurde, an das typische Muster der "Cycle Sequencing"-Reaktion: Denaturierung,

Primeranlagerung und Sequenzreaktion. Das "Cycle Sequencing" lief in 25 Zyklen mit folgendem Reaktionsprofil ab:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	95 °C	30 s	Denaturierung
1	60 °C	30 s	Primeranlagerung
1	60 °C	4 min	Elongation

Nach dem "Cycle Sequencing" wurden die überschüssigen dNTPs mit Hilfe des "Dye Ex™ Spin Kit" (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers abgetrennt, in der Speed Vac getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Eine andere Möglichkeit zur Abtrennung überschüssiger dNTPs war die Verwendung des "QIAquick Nucleotide Removal Kit" (Qiagen, Hilden). Zum gereinigten Produkt wurden 50 µl steriles MilliQ-H₂O zugegeben. Die anschließende Fällung erfolgte mit 250 µl Ethanol (100 % v/v) für 30 min bei 16000 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde danach abgesaugt und das Pellet mit 250 µl Ethanol (70 %, v/v) gewaschen, erneut durch Zentrifugation (16000 x g, RT, 10 min) sedimentiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Aufreinigung der Sequenzierungsansätze im 96-well Maßstab wurden Multiscreen HV Platten (Millipore, Eschborn) mit Sephadex® G50 Superfine-Material (Amersham Pharmacia) verwendet und nach Angaben des Herstellers (Millipore, Eschborn) verfahren. Bis zur Sequenzierung wurden sämtliche DNA-Pellets bei –20 °C gelagert und in 20 µl Hi-Di Formamide (PE Biosystems) aufgenommen. Dieses konnte dann direkt für die Elektrophorese, die beim ABI PRISM™ 377 in 4,25 %-igen Polyacrylamidgelen mit einer Trennstrecke von 48 cm erfolgte, eingesetzt werden. Sämtliche Sequenzierungsarbeiten am ABI PRISM™ 337 DNA-Sequencer und am ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser wurden freundlicherweise in der Abteilung Mikrobiologie an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis durchgeführt.

2.9.1 Auswertung der Sequenzdaten

Die Fluoreszenzsignale wurden vom ABI PRISM 337 DNA-Sequencer bzw. ABI PRISM Genetic Analyser automatisch mit der zugehörigen Software (Datensammlung: ABI PRISM™ 377 Data collection Version 2.1 und ABI PRISM™ 377 Sequence Analysis, Version 3.2, bzw. mit der ABI PRISM™ 3100 Data collection Version 1.0.1 und ABI PRISM™ 3100 Sequence Analysis, Version 3.7, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) in Sequenzdaten umgewandelt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Chromas Version 1.41 (Brisbane, Australien). Sequenzabgleiche

wurden mit den aktuellen Versionen der Programme BLASTN und BLASTX beim NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und "The Institute of Genomic Research" (TIGR) (<http://www.tigr.org>) durchgeführt sowie mit einer hauseigenen DNA-Sequenzdatenbank von *P. putida* KT2440.

2.10 Spezifischer Nachweis von DNA

2.10.1 Southern Blot

Der DNA-Transfer aus Agarosegelen auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran vs. 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech, UK) erfolgte mittels Vakuumblots.

Die zu übertragende DNA (mit *Stu*I-verdaute chromosomale DNA von *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten) wurde in einem 0,8 %-igem Agarosegel (20 -25 V ü/N-Lauf) mit einem DiG-markierten Längenmarker als Standard (DNA Längenstandard II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgetrennt, kurz in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Um Strangbrüche in der DNA zu erzeugen, die den DNA-Transfer auf die Membran begünstigen, wurde das Gel für 2 min unter einem UV-Cross linker (Stratagene UV Cross linker[®] 1800) gelegt. Zur Depurinisierung wurde das Gel für 20 min in 0,2 N HCl behandelt. Nach dreimaligem Waschen in H₂O_{dest} wurde das Gel zweimal für 15 min in Denaturierungspuffer inkubiert, was zu Einzelstrangbrüche in der DNA führt. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation in Neutralisationspuffer an. Für den Blot wurde eine Hybond N⁺-Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, UK) und 4 Stück Whatmanpapier auf die Größe des Gels geschnitten. Auf die Fritte der Vakuumblotanlage (Pharmacia LKB, Vacu Gene XL) wurde eine Lage trockenes Whatmanpapier gelegt und mit H₂O_{dest} befeuchtet. Darauf folgte die Membran (30 min in 20 x SSC getränkt) sowie das neutralisierte Gel mit den Taschen nach unten ("upside down"). Auf das Gel wurden 3-4 Lagen Whatmanpapier (30 min in 20 x SSC getränkt) gelegt und der Stapel mit Saran-Folie sowie Geltrocknergummi abgedichtet, damit beim Anstellen der Vakuumpumpe ein Vakuum erzeugt wurde. Das Gel wurde 2 h bei RT unter Vakuum geblottet. Nach Beendigung des Southern Blots wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend fotografiert, um den Erfolg des DNA-Transfers zu überprüfen. Die Membran wurde für 2 min unter einem UV-Cross linker gelegt, um die transferierte DNA an die Membran zu fixieren. Bis zum spezifischen DIG-Nachweis konnte die Membran in einem Autoklavierbeutel bei RT gelagert werden.

Denaturierungslösung:

NaOH 0,5 M

NaCl 1,5 M

H₂O_{dest} ad 1000 ml**20 x SSC:**

NaCl 3 M

Na-Citrat (pH 7) 0,3 M

H₂O_{dest} ad 1000 ml**Neutralisationspuffer:**

Tris-HCl (pH 7,5) 1 M

NaCl 2 M

H₂O_{dest} ad 1000 ml**2.10.2 Digoxigenin (DIG)-markierung von Oligonukleotiden mittels PCR**

Die Herstellung der markierten Gensonde Kan-2 (Kanamycinresistenzgen) zum Nachweis der Tn5-Integration in das *P. putida* KT2440-Genom erfolgte mittels PCR. Der PCR-Ansatz entsprach dem Standard-PCR-Ansatz mit dem Unterschied, dass anstelle der beschriebenen dNTP-Stammlösung ein dNTP-Gemisch eingesetzt wurde, indem ein DIG-markiertes dUTP enthalten war (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; No. 1 585 550). Die so synthetisierte Kanamycinresistenzgenkassette (Kan-2) wurde neben einem DNA-Fragment, das parallel ohne DIG-Markierung amplifiziert wurde, auf ein Agarosegel aufgetragen. So zeigte sich, dass die markierte Kanamycinresistenzgenkassette ein höheres Molekulargewicht (ca. 1,2 kb) als das unmarkierte Fragment (ca. 1,1 kb) aufwies. Die DIG-markierte Sonde wurde bei -20 °C gelagert und lt. Herstellerangaben (10 µl markierte Gensonde/ml Hybridisierungslösung) in die DNA-DNA-Hybridisierung eingesetzt.

2.10.3 DNA-DNA Hybridisierung

Die Nitrocellulosemembran mit der daran gebundenen DNA (s. 2.10.1) wurde vor der eigentlichen Hybridisierung prähybridisiert, um unspezifische Nukleinsäurebindstellen auf der Membran zu blockieren. Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen übertragen und mit 20 ml Prähybridisierungslösung (für eine 11 x 14 cm große Membran) für 2 h bei 68 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Hybridisierungsofen (Techne Hybridiser HB-1D) mit rotierenden Einbau, so dass die Lösung permanent bewegt wurde. Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung abgegossen und durch 10 ml Hybridisierungslösung, die 100 µl frisch denaturierte (10 min Inkubation bei 95 °C) DIG-markierte DNA-Sonde (s. 2.10.2) enthielt. Wichtig war, dass die Membran zwischen der Prähybridisierung und

Hybridisierung nicht trocken wurde. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 68 °C im Hybridisierungssofen.

Prähybridisierungslösung:

5 x SSC

0,1 % Na-Laurylsarcosin

1,0 % Blockierungsreagenz

0,02 % SDS

Für die Hybridisierungslösung wurde zur Prähybridisierungslösung noch die lt. Herstellerangaben erforderliche Menge an DIG-markierter Gensonde gegeben.

2.10.4 Nachweis DIG markierter DNA

Das Prinzip der Visualisierung der Digoxigenin-markierten DNA beruht auf der Kopplung eines an alkalischer Phosphatase gebundenen Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragment, No. 1 093 274, Roche Diganostics GmbH, Mannheim) an markierte DNA. Der Antikörper dephosphoryliert anschließend ein chemolumineszentes Substrat (CDP Star, No. 2 041 677, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Das instabile Produkt der Dephosphorylierung wird schließlich auf einem Polaroidfilm dokumentiert.

Zum Chemolumineszenznachweis wurde die wiederverwertbare Hybridisierungslösung (s. 2.10.3) entfernt und bei -20°C gelagert. Die Membran wurde zunächst im Hybridisierungsröhrchen zweimal für 5 min in 2 x SSC/0,1 % SDS bei RT unstringent und anschließend zweimal für 15 min bei 70 °C in 0,1 x SSC/1,0 % SDS (vorher auf 70 °C erwärmt) stringent gewaschen, um ungebundene DIG-DNA-Sonde, die einen unerwünschten Hintergrund erzeugen wurde, zu entfernen. Für die weiteren Detektions- und Waschschrte wurde die Membran in eine Plastischale überführt und alle Schritte wurden unter leichtem Schwenken durchgeführt. Die Membran wurde für 5 min in Waschpuffer inkubiert und anschließend für 30 min in Blockierungspuffer gelegt, um ein Blockieren von unspezifischen Nukleinsäurebindungsstellen auf der Membran zu erreichen. Die Bindung des Antikörperkonjugats an die Digoxigenin-markierten Nukleotide der DNA-Sonde erfolgte durch Inkubation in 20 ml Antikörperlösung (20 ml Puffer 2 + 3 µl Anti Digoxigenin-Ap Fab fragments). Die Membran wurde zweimal für 15 min in Waschpuffer gewaschen und durch eine 5-minütige Inkubation in Puffer 3 äquibriert.

Die Lumineszenzreaktion wurde durch Inkubation der Membran für 10 min in 1:5 mit Puffer 3 verdünnter "CDP Star Ready to use-Lösung" (No. 2 041 677, Roche diagnostics GmbH, Mannheim) gestartet. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch Abtropfen auf Whatmanpapier entfernt und die Membran wurde in einer Folie eingeschweißt. Danach wurde die Folie enthaltene Membran in einer Filmkassette mit einem Polaroidfilm (Kodak X-OMAT AR Film XAR-5, No. 844 7195) für 45 min bis 2 h gelagert. Der Film wurde in einer Entwicklermaschine (AGFA Curix 60) entwickelt, fixiert und gewässert und so die Banden sichtbar gemacht.

Puffer 1:

Maleinsäure 0,10 M

NaCl 0,15 M

pH 7,5

Puffer 2:

Blockierstammlösung 10 % in Puffer 1

Waschpuffer:

Tween-20 0,3 % (w/v) in Puffer 1

Blockierstammlösung:

Blockierreagenz 10 % (w/v) in Puffer 1

Puffer 3:

Tris 0,1 M

NaCl 0,1 M

pH 9,5

2.11 Arbeiten mit Weizensamen und Weizenkeimlingen

2.11.1 Oberflächensterilisation

Die äußerliche Sterilisierung von Samen ist Voraussetzung für die Aufzucht steriler Pflanzen. Eine effektive Oberflächensterilisation wurde mit dem mikrobiziden Reagenz Natriumhypochlorit (6–14 % Chlor aktiv) unter Zusatz des oberflächenaktiven Agens SDS (0,5 % SDS, w/v) erreicht. Die Weizensamen der Sorte ETA wurden für eine halbe Stunde unter Rühren in dem Natriumhypochlorit-SDS-Gemisch behandelt. Danach schlossen sich wiederholte Waschschrte mit sterilem Wasser an, um die Pflanzensamen von den Chemikalien/Detergenzien zu befreien.

2.11.2 Sterilitätskontrolle und Keimung

Ein Teil der potentiell oberflächensterilen Pflanzensamen wurde zur Keimung eingesetzt, der andere parallel zur Überprüfung der Oberflächensterilität. Dazu wurden 1-2 potentiell oberflächensterile Weizensamen in verschiedenen Komplexmedien unter Schütteln bei 30 °C inkubiert.

Die Keimung der Samen erfolgte auf Wasseragar für 2-3 Tage bei 30 °C unter Lichtabschluss. Zur Gewährleistung eines ausreichenden Nährstoffangebots wurden die Samen wiederholt mit Pflanzennährlösung (s. 2.2.2.3) besprüht.

2.11.3 Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln durch *P. putida* KT2440 mit nachfolgender Zellernte

Sterile Weizenkeimlinge wurden 1-2 Tage in 2 ml Pflanzennährlösung in einem Reagenzglas bei Raumtemperatur inkubiert. Die Weizenkeimlinge wurden danach mit 10^7 - 10^8 Zellen/ml einer Übernachtskultur von *P. putida* KT2440 beimpft und für eine unterschiedliche Zeitdauer inkubiert, bevor sie geerntet wurden.

Für die Zellernte wurden sowohl die planktonischen Zellen aus der Rhizosphäre (Pflanzennährlösung mit Zellen) als auch die direkt an den Wurzeln adhäsieren Zellen geerntet. Die planktonischen Zellen wurden hierzu pelletiert, zweimal in PBS-Puffer gewaschen und das Zellpellet bis zur Proteinextraktion bei -20 °C aufbewahrt. Für die Ernte der an den Weizenwurzeln adhäsieren Zellen wurden die Wurzeln von den Weizenkeimlingen abgetrennt und die Wurzeln mit 1ml PBS-Puffer in einen Stomacherbeutel (Seward London, UK) überführt. Anschließend wurde der die Wurzeln enthaltene Stomacherbeutel in einem Stomacher®80 (Seward, London, UK) gelegt und dreimal für jeweils 30 Sekunden bei mittlerer Stufe (Norm) im Stomacher®80 behandelt. Zur Trennung der Bakterienzellen von den Wurzeln wurde der Inhalt des Stomacherbeutels (Puffer-Bakterien-Wurzelgemisch) in eine sterile 10 ml Spritze gegeben, deren Ende mit steriler Glaswolle gefüllt war und filtriert. Das Bakterienfiltrat wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen, die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und das Zellpellet bis zur Proteinextraktion bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.3.1 ³⁵S-Methionin-Labelling von Proteinen

Weizenkeimlinge und *P. putida* KT2440-Zellen wurden wie bereits beschrieben angezogen. Für das Pulse-Labelling-Experiment wurden die Weizenkeimlinge mit 10^8 Zellen/ml einer Übernachtskultur von *P. putida* KT2440 für 24 Stunden inkubiert und drei Stunden vor der Zellernte mit 21,4 µCi/ml Pro-Mix™ L-[³⁵S]-*in vitro* Cell Labelling Mix (Code: SJQ0079 Amersham Pharmacia Biotech, UK) markiert. Die planktonischen Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, zweimal mit PBS-Puffer (pH 7,3) gewaschen und in Rehydrierungslösung in einem Ultraschallbad

aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden erneut zentrifugiert und der resultierende Proteinextrakt sofort für die 1. Dimension vorbereitet. Nach Durchführung der 2 D-Gelelektrophorese (s. 2.13.1.4–2.13.1.5) und anschließender Silberfärbung (2.13.2.2) wurden die Gele in einem Gelrockner getrocknet, für 2 Tage in einer Fotokassette exponiert und anschließend in einem Phosphorimager (Fujifilm BAS-2500) eingelesen.

2.11.4 Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln durch Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mit nachfolgender Zellernte

Zunächst wurden Wildtypstamm und die jeweilige Mutante separat in Minimalmedium mit Glucose ü/N angezogen, geerntet und die koloniebildenden Einheiten (CFU/ml) ermittelt. Anschließend wurden steril aufgezogene Weizenkeimlinge mit einer Mischkultur aus dem Wildtyp und der jeweiligen Mutante im Verhältnis 1:1 (Anzahl der CFU/ml) beimpft und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellernte wurde wie folgt durchgeführt. Die Weizenkeimlinge wurden für 5 s gevortext, damit leicht adhäsierende Zellen abfallen konnten. Danach wurden die Wurzeln von diesen Weizenkeimlingen befreit und in sterile Eppendorfgefäße überführt, die 1 ml PBS Puffer enthielten. Zur Trennung der Bakterienzellen von den Wurzeln wurden die Eppendorfgefäße bei 1400 rpm für 15 Minuten geschüttelt und anschließend nochmals für 1 Minute gevortext. Danach wurde aus dem Bakterienüberstand eine Verdünnungsreihe von 10^0 – 10^{-7} angefertigt und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-4} – 10^{-6} zunächst auf EM-Medium verteilt und inkubiert. Nach Koloniewachstum und Ermittlung der Gesamtlebendzellzahl (CFU/ml) wurden 150 Kolonien pro Parallelansatz auf EM-Kanamycin-Platten ausgestrichen und das Verhältnis von kanamycinresistenten zu sensitiven Kolonien nach Inkubation ermittelt.

2.11.5 Herstellung einer Wurzelexudatlösung aus Weizenkeimlingen

Die sterilen Pflanzen wurden wie unter 2.11.2 und 2.11.3 beschrieben erhalten. Danach wurden jeweils ein bis zwei sterile Pflänzlinge in 2 ml Pflanzennährlösung (s. 2.2.2.3) in einem sterilen Reagenzglas für 2–7 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ernte des Wurzelextraktes wurden die sterilen Pflanzen nach der Inkubation entfernt und ein Aliquot der Lösung zur Sterilitätsüberprüfung verwendet (Ausstrich und Inkubation auf EM-Medium). Der verbleibende Teil wurde sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BIO-RAD Microassay (BIO-RAD Laboratories, 1981) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblue G 250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch Bindung an Proteine (Bradford, 1976). Die Proben (10 µl) wurden mit 0,2 ml BIO-RAD Protein Assay Farbstoffkonzentrat (BIO-RAD, München) versetzt und 5-10 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in Mikrotiterplatten in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei 650 nm gegen einen Reagenzienleerwert. Die Proteineichkurve wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0-0,5 mg/ml aufgenommen. Alle Proben wurden als Dreifachansätze bearbeitet.

2.13 Zwei-dimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten

O'Farrel entwickelte 1975 die zwei-dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2 D-PAGE), in der Proteine nach den beiden unabhängigen Kriterien Ladung und Molekulargewicht aufgetrennt werden, wodurch die Untersuchung von mehreren hundert Proteinen auf einem Gel ermöglicht wird. Görg und Mitarbeiter verbesserten das Auflösungsvermögen und die Reproduzierbarkeit der 2-D Technik durch Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten bei der isoelektrischen Fokussierung (Görg *et al.*, 1985).

Die Durchführung der isoelektrischen Fokussierung ist der erste Schritt der zwei-dimensionalen Trennung von Proteinen nach O'Farrell (O'Farrell *et al.*, 1975). Bei der 2 D-PAGE mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) ist der pH-Gradient fester Bestandteil des Gels, der durch Kopolymerisation der *Immobiline*[®] (Acrylamidderivate mit puffernden Gruppen) mit den Acrylamidmonomeren entsteht. Jedes Proteinmolekül bewegt sich innerhalb dieses pH-Gradienten durch das Gel bis zu der Stelle, an dem seine Nettoladung null ist, also sein isoelektrischer Punkt erreicht ist. Die zweite Dimension wird als vertikale SDS-Elektrophorese durchgeführt. Das Detergenz SDS (Sodium-Dodecylsulfat) zerstört hierbei zum einen die Quartärstruktur von Proteinen und bindet zum anderen an hydrophobe Proteinbereiche. Durch die negativen Ladungen der zahlreich angelagerten Dodecylsulfate spielt die proteineigene Ladung bei dieser Elektrophorese keine Rolle mehr, und die Trennung erfolgt lediglich entsprechend der

molekularen Masse. Die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) ist zur Auftrennung und Massenbestimmung von Proteinen insbesondere auch mit geringen molekularen Massen geeignet.

2.13.1 Durchführung der 2D-PAGE

2.13.1.1 Proteinextraktion

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.8 und 2.11.3 beschrieben, geerntet. Anschließend wurden sie mit PBS-Puffer gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert (7000 x g, 15 min, 4 °C). Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt und das Zellpellet in maximal 1 ml Rehydratisierungslösung aufgenommen (alternativ hierzu: in 4% CHAPS, 2 mM Tris-Base-Lösung, wenn eine heiße Phenolpräzipitation folgte). Der Zellaufschluss erfolgte in einer Ultraschallapparatur LabsonicU (B. Braun Biotech International) mit einer Sonde von 3 mm Durchmesser in 0,6 s Intervallen für 30 s bei einer Einstellung von 91-96 Watt auf Eis. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für weitere 20 min in einen Schüttler bei 1200 rpm und Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Zelltrümmer (16000 x g, 4 °C, 30 min) zentrifugiert. Der Überstand (extrahierte Proteine) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Proteinbestimmung und für die 2 D-Gelelektrophorese aufbewahrt.

9 M Harnstofflösung:

Harnstoff 9 M
MilliQ-H₂O ad 20 ml
Danach erfolgte die Zugabe von Serdolit,
das Gemisch wurde 15 min gerührt und
anschließend durch einen Faltenfilter
filtriert.

Rehydratisierungslösung für IPG-

Streifen:

Thioharnstoff 2 M
CHAPS 4 %
Tris- Base 2 mM
Harnstofflösung (9 M) ad 1000 ml
Diese Lösung wurde in 10 ml- Aliquots
abgefüllt und bis zur Verwendung bei
-20 °C gelagert. Kurz vor Verwendung
wurden den Aliquots eine ½ Tablette
Proteaseinhibitor (Roche Diagnostics
GmbH, Mannheim) und 46 mg DTT
zugefügt.

2.13.1.2 Phenolextraktion mit anschließender Acetonfällung der Proteine

Als interferierende Substanzen bezeichnet man Komponenten, die die Solubilisierung der Proteine durch Interaktion beeinträchtigen und/oder den elektrophoretischen Prozess als solchen stören. Typische Substanzen sind z. B. Salze, Lipide, Nukleinsäuren, Polysacharide. Um solche Substanzen abzutrennen, wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Acetonfällung der Proteine durchgeführt.

Der Proteinextrakt (s. 2.13.1.1, in 4 %-iger Chaps/2 mM Tris-Base-Lösung) wurde mit dem gleichen Volumen an Tris-gesättigtem Phenol (pH 7.4) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Zu diesem Gemisch wurde das gleiche Volumen (bezogen auf das Gemisch) an MilliQ-H₂O gegeben, durch Vortexen gemischt und anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert. Das Gemisch wurde 10 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (8000 x g, 4 °C, 15 min). Die obere, wässrige Phase enthielt die interferierenden Substanzen wie Nukleinsäuren und Polysacharide und wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen; denaturierte Proteine sammelten sich an der Grenzschicht (Interphase). Die Fällung der Proteine erfolgte mit Aceton. Zu diesem Zweck wurden 2 Vol. eiskaltes Aceton (-20 °C) zu der verbleibenden Phenol- und Interphase gegeben, durch Vortexen gemischt und zentrifugiert (8000 x g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet für ca. 16 h bei Raumtemperatur oder ca. 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Bis zur isoelektrischen Fokussierung wurde das Proteinpellet in einem geeigneten Volumen an Rehydratisierungslösung durch Vortexen und Erwärmung bei Raumtemperatur gelöst, bei -20 °C gelagert und ein Aliquot zur Proteinbestimmung eingesetzt.

Alternativ hierzu wurde auch eine kalte Phenolfällung durchgeführt, wenn der Proteinextrakt Harnstoff enthielt. Der Proteinextrakt wurde mit dem doppelten Volumen an Tris-gesättigten Phenol (pH 7.4) versetzt, gemischt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (8000 x g, 4 °C, 15 min). Die Proteine bildeten eine weiße Interphase zwischen der phenolischen Phase und der wässrigen, oberen Phase. Die wässrige Phase wurde vorsichtig entfernt und zum verbleibenden Rest 2 Vol. MilliQ-H₂O gegeben, gemischt, 10 min auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert und die wässrige Phase verworfen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Zur Phenol- und Interphase wurde 2 Vol eiskaltes Aceton (-20 °C) gegeben, gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und die Proteine durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (8000 x g, 4 °C, 15 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet nochmals mit eiskaltem Aceton gewaschen, um Phenolreste zu entfernen. Das

getrocknete Pellet wurde in einem geeigneten Volumen an Rehydratisierungslösung resuspendiert bis zur weiteren Verwendung (Proteinbestimmung, 1. Dimension) bei -20°C aufbewahrt.

2.13.1.3 Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IEF-IPG)

Der bei -20°C gelagerte Proteinextrakt (s. 2.13.1.1, s. 2.13.1.2) wurde aufgetaut, die gewünschte Proteinmenge (50 bis 400 μg) abgenommen, ggf. mit Rehydratisierungslösung auf 290 μl verdünnt, mit 10 μl Bromphenollösung (25 mg/ml) und 4 μl der entsprechenden Ampholytlösung (pH 4-7 bzw. pH 3-10) versetzt und direkt in den IEF-Tray (PROTEAN IEF-Cell, Biorad, München) pipettiert. Die getrockneten 17 cm langen IPG- Streifen des jeweiligen pH-Bereiches wurden vor der eigentlichen Fokussierung direkt mit der Proteinprobe rehydratisiert. Dazu wurden sie luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten vorsichtig in den mit Proteinproben beladenen IEF-Tray hineingelegt. Um die Streifen vor Austrocknung bzw. der Auskristallisierung des Harnstoffs zu schützen, wurde eine ausreichende Menge an Silikonöl auf die Streifen pipettiert und die Kammer mit einem Deckel verschlossen. Nach 2 h passiver Rehydratisierung bei Raumtemperatur ohne Spannung, schloss sich eine aktive Rehydratisierung bei 50 V Spannung für 12 h an. Nach dieser Zeit erfolgte die eigentliche Fokussierung und die in MilliQ- H_2O -getränkten Elektrodenfilter wurden aufgelegt. Für den Gradienten galten folgende Parameter:

Temperatur	20 $^{\circ}\text{C}$	
Stromstärke	35 μA /Streifen	
Proteinmenge	bis zu 400 μg /Probe	
Stufe	Spannung (V)	Zeit (Vh)
1/1	50	1
1/2	300	450
1/3	1000	2400
1/4	5000	12000
1/5	5000	99999
1/6	5000	99999
1/7	1000	konstant

Nach 100-200 kVh war die isoelektrische Fokussierung beendet und die Gelstreifen wurden bis zur 2. Dimension in Klarsichthüllen bei -20°C eingefroren oder gleich für die 2. Dimension vorbereitet.

2.13.1.4 Äquilibrieren der IPG-Streifen

Vor der SDS-PAGE wurden die IPG-Gele nach Beendigung der 1. Dimension zunächst für die 2. Dimension zweimal für jeweils 15 min in Äquilibrierungspuffer geschüttelt, um einen optimalen Proteintransfer von der 1. zur 2. Dimension zu gewährleisten. Die Lösung des ersten Äquilibrierschrittes enthielt zusätzlich 1 % (w/v) DTT, das die vollständige Reduzierung denaturierender, nicht-alkylierender Proteine erhielt. Die zweite Äquilibrierungslösung beinhaltet Jodacetamid, das die Alkylierung von Sulfhydrylgruppen der Proteine und des restlichen DTT bewirkte und damit die Reoxidation während der Elektrophorese verhinderte. Ein weiterer Effekt war die Vermeidung von Streifenbildung im silbergefärbten 2 D-Gel (Görg *et al.*, 1985).

SDS-Äquilibrierungspuffer:

Tris-Base (1,5 M; pH 8.8)	50	mM
SDS	2	%
Glycerin (87 % v/v)	30	%
Harnstoff	6	M
H ₂ O _{dest} ad	200	ml

Diese Stocklösung wurde in 10 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C aufbewahrt. Für die erste Äquilibrierung wurden 10 ml Aliquot mit 100 mg DTT versetzt; für die zweite Äquilibrierung 10 ml- Aliquot mit 480 mg Jodacetamid versetzt und jeweils für 15 min inkubiert. Beiden Lösungen wurde noch jeweils 25 mg Bromphenolblau zugesetzt.

2.13.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das homogen vernetzte SDS-Gel wurde mit dem Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) ohne Sammelgel hergestellt und die 2. Dimension in der Regel über Nacht durchgeführt. Der Vernetzungsgrad betrug je nach Bedarf 10–15 %, 12–15 % oder 12–18% Polyacrylamid. Die Tabelle 2.7 zeigt die Rezeptur der benötigten Gellösungen für 22 Gele mit einer Dicke von 1,5 mm:

Tab. 2.7 Lösungen für die benötigten Gradientengele

Lösungen	Menge (ml) 10 %	Menge (ml) 12 %	Menge (ml) 15 %	Menge (ml) 18 %
Acrylamid/ Bisacrylamid (38 %/2 %)	366,7	428,6	535,7	660,0
Tris-HCl (1,5 M, pH 8.6)	275,0	275,0	275,0	275,0
SDS (10 %, w/v)	11,0	11,0	11,0	11,0
H ₂ O _{dest}	433,9	372,9	184,4	73,3
Glycerin (87 %, v/v)	—	—	88,0	74,5
10 % APS	11,0	11,0	5,5	5,5
10 % TEMED	1,9	1,57	0,42	0,33

Die Lösungen wurden bei 4 °C für ca. 4-5 Stunden durchmischt, kurz vor dem Gießvorgang die Katalysatoren APS und TEMED dazugegeben und anschließend in einen Gradientenformer (Hoefer DALT Gradientformer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben. Die Gießkassette (Hoefer DALT Multiple Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde nicht vollständig mit der Gellösung gefüllt, damit noch ausreichend freier Raum zwischen den Glasplatten blieb, um die IPG-Streifen noch auflegen zu können. Die SDS-Gele wurden nach dem Gießen mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um eine glatte und horizontale Gelkante zu erzeugen. Der Polymerisationsvorgang dauerte ca. 2 Stunden. Die Gradientengele wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C in Tankpuffer (SDS-Elektrodenpuffer) gelagert. Für die 2. Dimension wurden die fokussierten und äquilibrierten IPG-Streifen mit einer Pinzette seitlich auf die Gelkante des SDS-Gels gelegt und mit flüssiger 0,5 %-iger Agarose fixiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die SDS-Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Um eine Diffusion der fokussierten Proteine zu verhindern, wurde während der Beladung der Elektrophoresekammer eine Spannung von 50 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 100-150 V erhöht und der Lauf nach ca. 2000 Vh beendet. Als molekularer Massenstandard fand der SDS-Standard (Biorad, München) mit folgenden Eichproteinen Verwendung: Phosphorylase B (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa). Als Laufpuffer diente Tris-Glycin-SDS-Puffer. Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einer ISO-DALT Elektrophoreseeinheit (Amersham Pharmacia, Biotech, Freiburg) durchgeführt.

SDS-Elektrophoresepuffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer):

Tris		25	mM
SDS		0,1	%
Glycin		192	mM
H ₂ O _{dest}	ad	20	l

2.13.2 Proteinfärbung**2.13.2.1 Kolloidale Coomassiefärbung**

Roti-Blue[®] ist eine kolloidale Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung für Proteine in Polyacrylamidgelen. Durch seine kolloidalen Eigenschaften bindet der Farbstoff mit hoher Spezifität an Proteine und nur minimal an die Gelmatrix. Zur Proteinfärbung wurden die Gele zunächst für mindestens 2 h in 10 % Trichloressigsäure (TCA) fixiert und danach 24 h in Roti-Blue[®]-Lösung gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurden die Gele in H₂O_{dest} geschwenkt, das mehrmals ausgetauscht wurde.

Roti-Blue[®] Färbelösung für Gele:

H ₂ O _{dest}	500	ml
Methanol	200	ml
Essigsäure (100 %)	100	ml
Roti-Blue (5 x konz.)	200	ml

Zunächst wurden Wasser, Methanol und Essigsäure zusammengegeben und Roti-Blue[®] unter Rühren zugefügt.

2.13.2.2 Silberfärbung (BLUM *et al.*, 1987, mod.)

Bei geringen Proteinkonzentrationen wurde eine unspezifische Proteinfärbung mit Silbernitrat unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach dem Fixieren in Fixierlösung (2 h) wurden die Gele dreimal für 30 min in Ethanol (30 %, v/v) gewaschen. Es folgte eine Inkubation in Thiosulfatlösung (1 min) und drei Waschschrte mit H₂O_{dest} (30 s). Die Gele wurden danach für 2 h mit Imprägnierer behandelt und anschließend dreimal in H₂O_{dest} gewaschen (30 s). Zur Visualisierung der Proteine wurden die Gele solange in Entwicklerlösung eingelegt bis die gewünschte Farbintensität der Proteine (Proteinspots) erreicht wurde. Die Färbung wurde nach kurzem Abspülen mit H₂O_{dest}.

durch eine 5-minütige Inkubation mit Stopplösung und dreimaligem Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (20 s) beendet. Sollten die Gele länger aufbewahrt werden, wurden diese ü/N in Trocknerlösung (30 % Ethanol, 3 % Glycerin) überführt, anschließend zwischen zwei ebenfalls in Trocknerlösung äquilibrierte Cellophanfolien (Hoefer No. 80-6430-179) gelegt, in einem Rahmen zum Geltrocknen eingespannt und ü/N in einem Geltrockner getrocknet (Easy Breeze Gel Dryer, Hoefer Scientific Instruments, USA).

Fixierer:

Ethanol (techn.)	800	ml
Eisessig	191	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad	2000	ml

Imprägnierer:

AgNO_3	4	g
Formaldehyd (37 %, v/v)	0,4	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad	2000	ml
Das Formaldehyd wurde direkt vor dem Gebrauch zugesetzt.		

Thiosulfatlösung:

$\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	400	mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ad	2000	ml

Entwickler:

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	60	g
$\text{Na}_2\text{SO}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,001	g
Formaldehyd (37 %, v/v)	1	ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad	2000	ml
Das Formaldehyd wurde direkt vor dem Gebrauch zugesetzt.		

Stopp-Reagenz:

Glycin	10	g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad	2000	ml

2.13.2.3 Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium II tris (bathophenanthrolin disulfonat, RuBPs) (Rabilloud *et al.*, 2001, mod.)

Die Sensitivität der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium II tris (bathophenanthrolin disulfonat) entspricht in etwa der von Silbernitrat (5-10 ng/Bande), ist aber im Gegensatz zu jener Färbung über einen Bereich von ungefähr 10 Zehnerpotenzen linear (Coomassie Brilliant Blue ca. 3 Zehnerpotenzen: 100 ng-100 mg). Die Ruthenium Chelate binden nicht-kovalent an die Proteine und können unter UV-Licht leicht sichtbar gemacht werden.

Die Gele wurden bis zu 16 Stunden fixiert, wobei der Fixierer (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) einmal ausgetauscht wurde. Anschließend wurden die Gele viermal für 30 Minuten in 20 % Ethanol gewaschen. Diese gründlichen Waschschrte waren notwendig, um die Essigsäure auszuwaschen, da diese die Fluoreszenz des Ruthenium II Chelats negativ beeinflusste. Zur Fluoreszenzfärbung wurden die Gele unter

Lichtabschluss für 3–6 Stunden in eine 100–300 nM mit dem Fluoreszenzfarbstofflösung (20 mM RuBPS/20 % Ethanol) inkubiert. Vor der Detektion der Proteine wurden die Gele zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gründlich gewaschen und in Fixierlösung überführt

Zur Detektion der Proteine wurden die fluoreszenzgefärbten 2 D-Gele mit einer CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm unter Verwendung des Filters Y515 fotografiert. Die Belichtungszeit wurde so gewählt, dass der LAU-Wert des hellsten (putativ nicht regulierten) Gelspots zwischen 14000-16000 erreicht. Hierzu wurden die Gele zunächst fotografiert und im Programm AIDA Image Analyser vs. 3.21 der LAU-Wert überprüft und die Belichtungszeit entsprechend berechnet.

Mit dem Programm AIDA Image Analyser vs. 3.21 wurden die Gele in ein TIF Format konvertiert und mit Bildverarbeitungsprogrammen wie Adobe Photoshop vs. 6.0.1 und Microsoft Photo Editor für die Gelauswertung vorbereitet.

2.14 Computerunterstützte Gelauswertung

Die silber –und coomassiegefärbten 2 D-Gele wurden zur Dokumentation mit einem Umax Power LookIII Scanner (Software: Magic Scan 4.3) mit Durchlicht und einer Auflösung von 300 dpi im TIF Format gescannt. Mit dem Auswertungsprogramm Z3 vs. 1.5 (Compugen Ltd. Tel Alviv, Israel) wurden die 2D-Gele aus den entsprechenden Experimenten miteinander verglichen und so die unterschiedliche Proteinexpression bestimmt.

2.15 Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Um die Proteine massenspektrometrisch identifizieren zu können, wurden die potentiell interessanten Proteinspots aus den 2 D-Gelen herausgeschnitten und entfärbt. Nach proteolytischer Spaltung wurden die entstandenen Peptidfragmente aus der Gelmatrix eluiert, aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert.

2.15.1 Entfärben von Proteinspots

2.15.1.1 Coomassiegefärbte Proteinspots

Die ausgestanzten Proteinspots wurden 15 min unter starkem Schütteln (Eppendorf-Mixer, 1200 rpm) in einer 10 mM Ammoniumbicarbonatlösung neutralisiert. Anschließend folgte ein zweimaliger Waschvorgang in 400 µl 50 %-iger Acetonitrillösung (in 10 mM Ammoniumbicarbonatlösung) bis zur Entfärbung der Spots. Zum Trocknen wurden die entfärbten Spots in eine Vakuumzentrifuge gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.15.1.2 Silbergefärbte Proteinspots mit Farmer's Reducer (Gharahdaghi *et al.*, 1999, mod.)

Die ausgestochenen Proteinspots wurden in Farmer's Reducer-Lösung unter Schütteln (Eppendorf Mixer, 1200 rpm) so lange entfärbt (ca. 2-30 min) bis keine braune Färbung mehr erkennbar war. Anschließend wurden sie mehrfach mit H₂O_{dest} gewaschen (10 min) und in 200 mM Ammoniumbicarbonatlösung neutralisiert (20 min). Hierauf folgte ein zweimaliges Waschen mit H₂O_{dest} und die anschließende Dehydrierung in 100 %-igem Acetonitril. Zum Trocknen wurden die entfärbten Spots in einer Vakuumzentrifuge dehydriert und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Farmer's Reducer:

K ₂ [Fe(CN) ₆]	30	mM
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	100	mM

wurden im Verhältnis 1 : 2 gemischt.

2.15.1.3 RuBPs gefärbte Proteinspots (Rabilloud *et al.*, 2001, mod.)

Die ausgestochenen Proteinspots wurden für 2 h in Ethanol (50 % v/v) geschüttelt (Eppendorf Mixer, 1200 rpm). Anschließend wurden sie mit 25 mM Ammoniumbicarbonat für 8 min gewaschen. Die abschließende Dehydrierung der Gelstücke erfolgte mit 100 %-igem Acetonitril für jeweils 8 min. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei jedes Mal der Überstand verworfen wurde. Zur vollständigen Trocknung wurden die entfärbten Spots in eine Vakuumzentrifuge gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.15.2 Proteolytischer Verdau von Proteinen und Extraktion der Peptide

Die spezifische Spaltung von Proteinen in kleinere Peptide erfolgte mit Trypsin, ein proteolytisches Enzym aus dem Pankreassaft, das die Polypeptidketten auf der Carboxylseite von Arginin- und Lysinresten hydrolysiert.

Zur Dehydratisierung der entfärbten Gelspots wurden je nach Gelstückgröße ca. 5–10 µl Trypsinlösung [$c(\text{Trypsin}) = 2 \text{ µg/ml}$ in 50 mM Ammoniumbicarbonat] zugegeben und für 30 min inkubiert. Hiernach die gleiche Menge an 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung zugegeben. Der proteolytische Verdau erfolgte ü/N bei 37 °C.

Zur Extraktion der Peptide wurden die Gelstücke mit 50 µl 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung versetzt und für 30 min unter Schütteln inkubiert. Der Überstand, der die wasserlöslichen Peptide enthielt, in einem neuen Eppendorfgefäß gesammelt. Zur zweiten und dritten Extraktion wurden die Spots jeweils mit 100 µl Acetonitril/Ameisensäure (60 % Acetonitril; 0,5 % Ameisensäure; 39,5 % $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) versetzt und wiederum für 30 min unter starkem Schütteln extrahiert. Die auf diese Weise gewonnenen lipophilen und sauren Peptide wurden wie beim ersten Extraktionsvorgang im Eppendorfgefäß gesammelt. Der gesammelte Extrakt wurde in einem Vakuumzentrifuge eingedampft (ca. 2–3 h) und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.15.3 Guanidinierung von Peptiden

Bei der Guanidinierung erfolgte eine Modifikation der C-terminalen Lysine (ϵ -Aminogruppe des Lysins) in tryptischen Peptiden mit *O*-Methylisoharnstoff zu Homoargininen, die im Vakuum des MALDI besser fliegen und deutlichere "peaks" in den Spektren ergeben (Hale *et al.*, 2000). Die eluierten, eingetrockneten Peptide wurden in 20 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat aufgenommen, 20 µl frisch angesetztes OMI (0,5 mM *O*-Methylisoharnstoff in 50 mM Ammoniumbicarbonat pH 10) zugegeben und ü/N bei Raumtemperatur inkubiert. Die guanidinierten Peptide wurden wiederholt im Vakuumkonzentrator eingetrocknet und wie unter 2.15.4 beschrieben aufgereinigt.

2.15.4 Aufreinigung von Peptiden mittels ZIP TIP™ für die massenspektrometrische Analyse

Die extrahierten Peptide wurden vor der massenspektrometrischen Analyse chromatographisch mittels ZIP TIP™ (Millipore) aufgereinigt.

Zur Probenkonzentrierung und -entsalzung wurden ZIP TIP™- μ C18 Pipettenspitzen, die "reversed phase" Material (RP18 Material für die Säulenchromatographie) enthielten, verwendet. Bei jedem Schritt wurde die Pipette mindestens fünfmal aufgezogen und entleert, wobei darauf zu achten war, dass das Säulenmaterial nicht trocken bzw. Luft hineingezogen wurde. Die Peptide wurden in 10 μ l 0,5 %-iger Ameisensäure resuspendiert. Zur Aktivierung der Zip Tip-Säulen wurden diese zweimal mit 50 %-iger Acetonitrillösung gespült und in 0,5 %-iger Ameisensäure äquilibriert. Dann erfolgte das Beladen des Säulenmaterials mit den Proben durch 10-maliges Herauf- und Herunterpipettieren der Peptidlösung. Nach dem Waschen der Zip Tips in 0,5 %-iger Ameisensäure wurden die Peptide eluiert.

Waren die Peptidproben für die MALDI-(matrix assisted laser desorption ionisation) Massenspektrometrie bestimmt, so wurden 2 μ l dieser Proben zusammen mit der Matrix (10 mg α -cyano-4-hydroxycinnamic acid/50 % Acetonitril/0,5 % Ameisensäure/49,5 % Milli-Q-H₂O) auf die Messpunkte eines Malditargets eluiert. Nach einigen Minuten trockneten die Proben, da die Matrixsubstanz mit den Peptiden kokristallisierte, und das Target wurde in das MALDI eingeschleust (s. 2.16.1). Die Messung erfolgte mit dem Ultraflex™ MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

Für die Massenspektrometrie mittels Q-TOF (s. 2.16.2) wurden die Peptide in 5 μ l Elutionslösung (70 % Methanol/0,1 % Ameisensäure/29,9% Milli-Q-H₂O) in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.16 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Analysemethode zur Bestimmung der Molekülmassen von Biomolekülen im Hochvakuum und wurde zur Identifizierung der Proteinspots aus 2D-Gelen eingesetzt. Vor allem die Methode des Peptidmassenfingerabdrucks ermöglicht eine schnelle und sensitive Identifizierung. Hierbei wurden die Proteine mit

Trypsin gespalten, entsalzt und die Massen der spezifischen Peptide durch MALDI (matrix assisted laser desorption ionisation) oder Q-TOF (Quadropol- Time of flight) bestimmt. Diese Peptidmassen wurden anschließend mit einer Datenbank verglichen, die die translatierte Genomsequenz von *P. putida* KT2440 enthielt und virtuell mit Trypsin verdaut wurde.

2.16.1 MALDI-Massenspektrometrie

Die MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionisation) nutzt aus, dass eine schlecht absorbierende Verbindung bei wesentlich niedrigeren Energiedichten durch Einstrahlung eines Laserpulses ionisiert wird, wenn sie in einem Gemisch mit einer stark absorbierenden Verbindung – der Matrix – vorliegt. Bei der MALDI-Methode werden tryptische Peptide mit einem Überschuss der organischen Matrixsubstanz vermischt, auf einen Probenträger (Target) aufgetragen und mit einem Laser ionisiert. Unter Vakuum werden die Peptidionen im elektrischen Feld beschleunigt und anhand der Ionenflugzeit (time of flight, TOF) zwischen Quelle und Detektor die Peptidmassen bestimmt. Die Matrix absorbiert den Hauptteil an Energie aus dem Laserpuls und schützt so die Probe vor photolytischer Zersetzung, sie überträgt die zur Desorption notwendige Energie auf die Probenmoleküle, sie stellt die für die Ionisierung notwendigen Ladungsträger zur Verfügung, sie reduziert die Wechselwirkung der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Metalloberfläche des Probenträgers und erleichtert dadurch die Desorption.

Für die Proben wurden wie unter 2.15.2 beschrieben vorbereitet und in einem Ultraflex™ MALDI-TOF analysiert (Bruker Daltonik GmbH, Bremen).

2.16.2 Grundprinzip der Q-TOF

Bei der Q-TOF Analyse (Quadropol- Time of flight) werden die tryptischen Peptide durch Elektrosprayverfahren im elektrischen Feld unter Vakuum beschleunigt und ihre Peptidmassen anhand der Flugzeiten bestimmt. Im Gegensatz zum MALDI-TOF, wo dies nur bedingt möglich ist, können hier auch Peptide sequenziert werden. Hierfür kann man ein Peptid auswählen und in einer Kollisionskammer durch das Zusammenstoßen mit Argonmolekülen zerbrechen lassen, wobei eine Spaltung zwischen den einzelnen Aminosäuren auftritt. Den Massenunterschieden der Peptidfragmente kann man dann Aminosäuren zuordnen und so eine Teilsequenz bestimmen.

Für die Messung der Peptide im Q-TOF wurden 1-2 µl der gereinigten Peptide in Lösung eingesetzt (s. 2.15.2). Die Messung wurde mit dem Q-TOF™ 2 (Micromass UK LM) durchgeführt.

Die massenspektrometrischen Bestimmungen wurden freundlicherweise unter der Leitung von Herrn Dr. Manfred Nimtz in der Abteilung Strukturbioogie an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH durchgeführt.

2.16.3 Auswertung massenspektrometrischer Daten

Die massenspektrometrischen Daten aus der MALDI-Analyse wurden mit dem Programm Bruker Data Analysis ausgewertet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mit dem Programm MS Fit (Protein Prospector vs. 3.4.1 package, UCFS Mass Spectrometry Facility) mit einer Proteindatenbank verglichen, die *in silico* durch Translation der *P. putida* KT2440-Nukleinsäuresequenz und anschließenden theoretischen Trypsinverdau generiert wurde. Auf diese Weise konnten die Proteine anhand ihres Peptidmassenfingerabdrucks identifiziert werden.

Die mittels Q-TOF Analyse erhaltenen massenspektrometrischen Daten wurden mit Hilfe der Programme MassLynx sowie BioLynx ausgewertet und die Peptidsequenzen mit der *P. putida* KT2440 Proteindatenbank verglichen.

2.17 Mikroskopie

2.17.1 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die in Minimal- Glucose-Medium gewachsenen Kulturen zunächst bei 3000 x g pelletiert und zweimal vorsichtig in 10 mM Hepes-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die vegetativen Zellen in einer Glutaraldehydlösung (2,5 % v/v Glutaraldehyd) fixiert und an mit Formvar behandelten Kupfergrids (300 Square mesh) für 20-90 s, in Abhängigkeit von der Zelldichte, absorbiert, mit Filterpapier geblottet und abschließend luftgetrocknet. Die Proben wurden in einer MED020 Bedampfungseinheit (Baltec) mit Platin/Kohlenstoff bis zu einer Dicke von 4 nm in einem Bedampfungswinkel von 15° schrägbedampft. Mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss CEM 902, herkömmliche Einstellung, 30 µm Objektiv, 80 kV Beschleunigungsspannung) wurden die Proben bei einer Vergrößerung von x 3000-x 30000 untersucht und fotografiert (Agfa Scientia

23D56 P3 AH; Agfa-Grevaert).

Die Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf und Frau Elke Barth in der Abteilung Mikrobiologie an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig durchgeführt.

2.17.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Detektion *gfp*- und *rfp*-exprimierender Zellen und der Siderophordefektmutanten erfolgte mit dem Photomikroskop "Axiophat" (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Fluoreszenzeinrichtung.

Das nötige Auflicht wurde durch eine Quecksilberlampe-Kurzbogenlampe (Osram HBO 50 W/AC) und folgenden Filtersätzen erzeugt:

- Filtersatz 487901 (UV-Filter) Anregung UV-H 365, Anregungsfilter: BP 365/12, Farbteiler: FT 395, Sperrfilter: LP 397.
- Filtersatz 48710 (Blaufilter) Anregung 450-490 SB, Anregungsfilter: BP 450-490, Farbteiler: FT510, Sperrfilter: LP 515-565.

Für das Fluoreszenzlicht wurden Plan-Neofluor-Objektive verwendet. Zur Dokumentation wurden die Bilder mit der in das Mikroskop integrierten Kamera, die durch ein Kamerabedienpult bedient werden konnte, aufgenommen. Es wurden 400 ASA Diafilme (Fuji) verwendet.

2.18 Chemikalien, Biochemikalien und Geräte

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; BIO-RAD GmbH, München, Difco Laboratories, Detroit, USA; Fluka Chemie AG, Neu-Ulm; Life Technologies GmbH, Eggenstein; Merck, Darmstadt; OXOID Unipath GmbH, Wesel; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe; Serva Feinbiochemikalien GmbH & Co., Heidelberg; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen im Reinheitsgrad "p.a." oder "reinst" bezogen. Die Restriktionsenzyme und alle anderen DNA modifizierenden Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs, Bad Schwalmbach; MBI Fermentas, St. Leon-Rot und Stratagene GmbH, Heidelberg. Von

der Firma Life Technologies GmbH, Eggenstein wurden die Oligonukleotide verwendet. Membranfilter wurden von Sartorius AG, Göttingen; Millipore GmbH, Eschborn sowie Nucleopore GmbH, Tübingen bezogen. Elektroporationsküvetten wurden von PeqLaB Biotechnologie GmbH, Erlangen benutzt. Die Immobililine Dry Strips wurden von der Firma BIO-RAD GmbH, München verwendet.

Die noch nicht näher beschriebenen Geräte wurden hier zusammengestellt.

Autoklaven	Technomara Technoklav 50
Automatische Sequenzierer	Applied Biosystems Modelle: 377, 3100 Genetic analyser
Brutschränke	Heareus
Computer	ATD
Computerprogramme	Microsoft Office 2000, Adobe Photoshop Vs. 6.0, Genome Viewer, EndNote4.0
Elektrophoresekamern	GIBCO BRL: Horizon 58, Horizon 11-14
Feinwaagen	Mettler AE260 Delta Range [®]
Geltrockner	Gel Dryer, Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco
Gel-Dokumentationsanlage	Herolab E.a.s.y Easy enhanced analysis
Genpulser	BioRad Gene Pulser II
Impfbank	Heraeus HLB2472
Kühlzentrifugen	Hearaeus, Sorvall RC3, RC5C, RC5C Plus
Magnetrührer	Heidolph MR3002 Framo [®] -Gerätetechnik M24/1
MALDI	Bruker Daltonik: Ultraflex [™] MALDI-TOF
Mikrowellenofen	Moulinex [®] Micro-chef M055
PCR Thermocycler	Eppendorf Mastercycler gradient, Perkin Elmer Gene Amp 9600
pH-Meter	Knick pH-Meter 761 calimatic
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Schüttler	Edmund Bühler
Spannungsgeräte	BioRAD, Pharmacia
Homogenisator	B.Braun LabsonicU
Scanner	UMAX Power LookIII
Speedvac-Konzentrator	Eppendorf Concentrator 5301, Savant: DNA Speed Vac DNA102, Speedvac concentrator mit Kühlfalle

Spektralphotometer	Milton Roy Spectromic 601, MWG Biotech Emax microplate reader
Stomacher	Seward Stomacher®80
Vortex	Janke und Kunkel IKA Klabortechnik VF2
Tischinkubator	Eppendorf Thermomixer comfort
Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge fresco, Eppendorf centrifuge 5417
Wasserbäder	Köttermann Labortechnik
Q-TOF	Micromass Q-TOF™ 2
Vakuumfiltrationssystem mit Unterteil für eine 96-well Platte	KNF Laboport Neuherberg und Millipore, Eschborn

3 Experimente und Ergebnisse

Im Rahmen der Totalsequenzierung von *P. putida* KT2440 sollten in einer Funktionsanalyse Gene und deren Genprodukte identifiziert werden, die für das habitatspezifische Überleben des Bakteriums relevant sind. Kürzlich wurde der Stamm als Besiedler von Pflanzenwurzeln wie Weizen, Mais, Erdbeere, Zuckerrübe und Spinat beschrieben und die *in silico* Genomanalyse ergab, dass *P. putida* KT2440 ein breites Repertoire von Genen und Operonen (u. a. Resistenz gegen Antibiotika, Siderophorsynthese) aufweist, die ein Bakterium für die Besiedlung dieses Lebensraumes benötigt. Für die effiziente Besiedlung der Rhizosphäre von Pflanzen wurden zu dem Gene beschrieben, die an der Adhäsion an Samen- und Wurzeloberflächen beteiligt sind (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; de Weger *et al.*, 1995). Der Mikroorganismus sollte darüber hinaus in der Lage sein, die von der Pflanze ausgeschiedenen Exudate wie z. B. Zucker und Aminosäuren zu verwerten (Lugtenberg *et al.*, 1999), um in der Rhizosphäre einen Überlebensvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen zu erlangen. Produkte, die das Pflanzenwachstum stimulieren (z. B. Auxin) oder dem Schutz der Pflanzen vor pflanzenpathogenen Mikroorganismen dienen (z. B. Toxine, Siderophore) werden oftmals von Rhizosphärenorganismen ausgeschieden (de Weger *et al.*, 1995).

Für die Untersuchung in der Rhizosphäre wurden Weizenkeimlingswurzeln gewählt, deren Samen effizient zu sterilisieren waren und in Pflanzennährlösung gearbeitet (s. 3.2). Die Identifizierung der für die Besiedlung relevanten Gene erfolgte durch Analyse von Transposondefektmutanten und unter Verwendung proteomanalytischer Methoden wie der 2 D-Gelelektrophorese und massenspektrometrischer Untersuchungen mit dem Wildtyp.

3.1 Generierung und Analyse von Transposondefektmutanten in *P. putida* KT2440

Die Generierung der Transposondefektmutanten erfolgte zunächst mit dem Mini-Tn5-Transposondeliverysystem (de Lorenzo *et al.*, 1990). Transposonmutanten sollten durch die Integration einer Transposonkassette mit einem promotorfreien *gfp*-Gen (Green-Fluorescent-Protein) und einer Antibiotikaresistenzdeterminanten hergestellt werden. Der Einsatz des Transposonsystems ermöglicht die Geninaktivierung und die

Quantifizierung der möglichen Genexpression kann erfolgen, da das *gfp*-Gen durch die chromosomale Tn5-Integration unter der Kontrolle des wirtseigenen Promotors stehen kann.

Um den Integrationsort der Transposition festzustellen, wurde die direkte Sequenzierung der genomischen DNA der Mutanten mittels Arbitray PCR (s. 2.5.1) durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Sequenz, die den Ort der Transposition flankiert, in zwei hintereinander geschalteten PCR-Amplifizierungsschritten angereichert und abschließend sequenziert (Caetano-Annoles, 1993; O'Toole und Kolter, 1998 a). Gelingt dies nicht, wurde die DNA der Transpositionsorte ausgewählter Mutanten kloniert und der den Insertionsort flankierende Bereich sequenziert. So konnten die phänotypischen Eigenschaften der Transposonmutanten den entsprechenden chromosomalen Bereichen (z. B. Gene, Operone) im Bakteriengenom zugeordnet werden.

3.1.1 Einsatzmöglichkeiten von Fluoreszenzmarkern zur Selektion und Detektion von Transkonjuganten in *P. putida* KT2440

Für die Mutagenese wurde zunächst das von Suarez und Mitarbeitern entwickelte Transposondeliverysystem eingesetzt. Der mini-Transposonvektor pAG408 (Suarez *et al.*, 1997) enthielt das *gfp42*-Gen promotorfrei, jedoch mit ribosomaler Bindungsstelle zusammen mit verschiedenen Resistenzgenen (Kanamycin, Ampicillin und Gentamycin) als Selektionsmarker. Je nach Transpositionsort im Rezipientenstamm *P. putida* KT2440 sollten unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zu erkennen sein.

Bei der Detektion und Selektion der bis dahin generierten Mutanten von *P. putida* KT2440 traten jedoch folgende Schwierigkeiten auf:

- Nach Konjugation des mini-Tn5-Transposonvektors pAG408 und Selektion der Transkonjuganten auf Minimal-Gm/Kan-Medium sollte das Wachstum des Donorstammes *E. coli* S17-1 λ pir/pAG408 nicht möglich sein. Es war allerdings nicht auszuschließen, dass sich Donorzellen bei der Konjugation an die Rezipientenzellen anheften und trotz des Selektionsdrucks über mehrere Generationen überlebensfähig blieben. Dies zeigte sich als Koloniematerial der Transkonjuganten in flüssigem Komplexmedium mit den entsprechenden Antibiotika inkubiert wurde. Die aus den Transkonjuganten erhaltene DNA war gering mit Donor-DNA kontaminiert, wodurch eine direkte Sequenzierung des Transposonintegrationsortes unmöglich wurde. Daher wäre eine Subklonierung des

Genortes unumgänglich gewesen.

- Durch die Selektion auf Minimalmedium wurden die Transkonjuganten nicht erfasst, die durch die chromosomale Integration des mini-Tn5-Transposons einen Defekt im Kohlenstoff- oder Aminosäurestoffwechsel zeigten.
- Der Rezipientenstamm *P. putida* KT2440 besitzt eine natürliche Fluoreszenz und ist in der Lage, blaues Licht zu absorbieren und Licht der Wellenlänge von 480 nm zu emittieren. Das aktive Chromophor im GFP absorbiert ebenfalls blaues Licht der Wellenlänge 395 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 509 nm. Bei der Transposonmutagenese handelte es sich um eine chromosomale Mutation, d. h. da das *gfp*-Gen nur einmal im Bakterienchromosom integrierte. Durch den geringen Unterschied im Emissionsspektrum von nur 30 nm wurde die Einordnung der Defektmutanten bezüglich einer reprimierten bzw. optimierten grünen Fluoreszenz im Gegensatz zum Wildtyp erheblich erschwert.

Wegen der genannten Schwierigkeiten sollte ein Fluoreszenzprotein eingesetzt werden, das bei einer anderen Wellenlänge als 400–500 nm Licht emittiert, damit es nicht zur Überlappung mit der Eigenfluoreszenz von *P. putida* KT2440 kam. So wurde ein rot fluoreszierendes Protein RFP verwendet, das aus der im indischen Ozean lebenden Seeanemone *Discosoma sp.* stammt (Matz *et al.*, 1999). Das rot fluoreszierende Protein RFP zeigt die Eigenschaften eines echten fluoreszierenden Proteins, bei dem die Energie für die Fluoreszenzreaktion gänzlich aus der elektromagnetischen Strahlung einer bestimmten Wellenlänge stammt. Das Emissionsmaximum des DsRed-Gens, das für das rot fluoreszierende Protein RFP kodiert, liegt bei 583 nm; das Absorptionsmaximum bei 558 nm. Der kommerziell bezogene pDsRed-Vektor (Clontech Laboratories, GmbH, Heidelberg, 1999) erwies sich als instabil und so wurden weitere Versuche mit diesem System eingestellt. Im Laufe der Arbeit wurde das DsRed-System vom Anbieter verbessert (Clontech Laboratories, GmbH, Heidelberg 2001).

3.1.2 Transposonmutagenese mit dem EZ::TN™ <Kan-2> Tnp Transposome™ in *P. putida* KT2440

Für die Transposonmutagenese in *P. putida* KT2440 wurde nun das von Goryshin und Reznikoff entwickelte *in vitro* Transpositionssystem für Tn5 verwendet, das sogenannte Transposomsystem (Goryshin und Reznikoff, 1998). Die Vorteile dieses Systems

gegenüber dem Transposondeliverysystem waren:

1. Die nicht-konjugative Transposition erlaubte die ausschließliche Arbeit mit Reinkulturen, während bei der Konjugation mindestens zwei Kulturen, also eine Mischkultur aus Donor- und Rezipientenstamm verwendet wurden.
2. Die direkte Sequenzierung der transposonflankierenden DNA-Sequenz zur Bestimmung der Transposonintegrationsortes wurde durch kontaminationsfreies Ausgangsmaterial möglich.
3. Die erhaltenen Transkonjuganten wurden auf Vollmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert. Auf diese Weise wurden Mutanten erfasst, die im zentralen Metabolismus, Energie- und Aminosäurestoffwechsel defekt waren, also einen auxotrophen Phänotyp zeigten.
4. Expressionsstudien ausgewählter identifizierter Gene und deren Genprodukte können unter Verwendung eines Suizidvektors mittels homologer Rekombination zusätzlich erfolgen.

Die Elektroporation des kommerziell erworbenen EZ::TN™ <Kan-2> Tnp Transposome™ (Epicentre Technology) in elektroporationskompetente *P. putida* KT2440 Zellen wurde wie unter 2.6.3 und 2.7 beschrieben durchgeführt. Die erhaltene Anzahl von kanamycinresistenten Transformanten betrug durchschnittlich 200 pro 20 ng Transposom, was 1000 Kan^r/μg Transposom entspricht. Diese Zahl stimmte mit den Angaben des Herstellers für *Pseudomonas* sp. überein (Epicentre Technology; Derbyshire *et al.*, 2000; Goryshin *et al.*, 2000). Auf diese Weise wurden 3500 *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten erhalten.

3.1.3 Screening und genetische Analyse der *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten

Die generierten Mutanten wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, auxotroph zu wachsen. Dieses Screening diente der Qualitätsüberprüfung der Mutantenbank und sollte zeigen, ob eine zufallsgemäße Verteilung von Mutationen im *P. putida* KT2440-Genom unter Verwendung des EZ::TN™ <Kan-2> Tnp Transposome™-System vorlag.

Die Mutantenbank wurde weiterhin auf Gene untersucht, die umweltspezifisch induziert werden. Hierzu gehörten Gene, die an der Biofilmbildung und an der Kolonisierung von

Pflanzenwurzeln beteiligt waren sowie solche, die die Eisenversorgung des Mikroorganismus unter Eisenlimitierung gewährleisten. Einige Mutanten, deren Genotyp darauf hindeutete, dass weitere phänotypische Eigenschaften zu erwarten waren, wurden differenzierter charakterisiert und auf ihre oxidative Stressantwort sowie ihre Beweglichkeit untersucht.

Zur Bestimmung des Integrationsort des Transposons im Genom wurde die transposonflankierende DNA-Sequenz über Arbitrary PCR amplifiziert. (Caetano-Annoles, 1993; O'Toole und Kolter, 1998 a, s. 2.5.1). Mit Hilfe dieser Methode wurde zeitaufwendiges Subklonieren umgangen und so eine große Anzahl Mutanten analysiert. So konnte mit dem Aufbau einer Mutantenbank begonnen werden, deren Mutanten genotypisch charakterisiert sind (s. Tab. 7.2). Die transposonflankierende DNA-Sequenz wurde zunächst mit einer hauseigenen Nukleinsäuredatenbank von *P. putida* KT2440 verglichen. Mit Hilfe der Genomkoordinaten erfolgte im Programm "Genome Viewer" die Lokalisierung der Transposonintegrationsstelle im Bakteriengenom und die Zuordnung der phänotypischen Eigenschaften der Mutanten zu chromosomalen Bereichen im Genom. Die gesamte DNA-Sequenz des *P. putida*-Genoms zum Aufbau einer Datenbank sowie das Programm "Genome Viewer" wurden im Rahmen des Projektes "Sequenzierung und Funktionsanalyse des *P. putida* KT2440 Genoms" freundlicherweise vom Projektpartner "The Institute of Genomic Research" (TIGR; Rockville, USA) zur Verfügung gestellt. Mit der Publikation des *P. putida*-Genoms im Dezember 2002 (Nelson *et al.*, 2002) wurden die Daten aktualisiert (<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast/index.cgi?database=GPP.seq>).

In nachfolgenden Kapiteln wurden die analysierten Mutanten (s. Abb. 7.1-7.17) in Tabellen zusammengestellt. Die Einteilung (Proteinname, Genbezeichnung, zelluläre Aufgabe/Funktion) wurde von der bisherigen Zuordnung/Annotation durch TIGR übernommen (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePieChart.spl?db=gpp>; http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/gene_table.spl?db=gpp; <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/LocusNameSearch.spl?db=>; Riley *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 2002). Um die Zuordnung der Proteinnamen zu erleichtern, wurde die englische Bezeichnung in den Tabellen benutzt und nur im laufenden Text die deutsche Bezeichnung verwendet.

3.1.4 DNA-DNA-Hybridisierung zum Nachweis der Tn5-Integration in das *P. putida* KT2440-Genom

Mikroorganismen, die unter Verwendung des EZ::TN™ Transposome™-Systems bereits mutagenisiert wurden, zeigten willkürlich verteilte, einmalige Tn5-Integrationen ins jeweilige Genom (Derbyshire *et al.*, 2000; Goryshin *et al.*, 2000; Guilhabart *et al.*, 2001). Um den Nachweis zu erbringen, dass die Tn5-Integration auch im *P. putida* KT2440-Genom nur einmal erfolgte, wurde eine Southernhybridisierung durchgeführt (s. 2.11, s. Abb. 3.1)

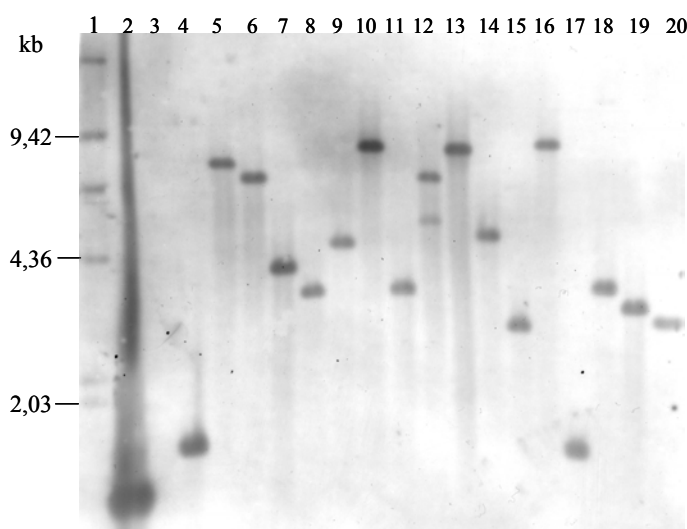


Abb. 3.1 Southernhybridisierung von 17 *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)- Mutanten

1-2 µg genomische DNA aus *P. putida* KT2440-Transposonmutanten und dem Wildtyp wurden mit *Stu*I vollständig gespalten und mit dem Kanamycinresistenzgen des EZ::TN™ <Kan-2> Transposons hybridisiert. Spur 1: 20 µl DIG-markierte Längenstandard II (Roche Diagnostics, GmbH); Spur 2: Negativkontrolle: *Stu*I-verdaute chromosomale DNA aus *P. putida* KT2440, der nicht mit dem EZ::TN™ <Kan-2> Tnp Transposom elektroporiert wurde. Spur 3: Positivkontrolle: Kanamycinresistenzgen des EZ::TN <Kan-2> Transposons; Spuren 4 -20: individuelle *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutantenklone.

Die Southernhybridisierung zeigte, dass keiner der isolierten Klone mehr als ein Hybridisierungsfragment enthielt, was eine einmalige Integration der Kanamycin-resistenzgenkassette im Chromosom bedeutete.

3.1.5 Aufbau einer genotypisch charakterisierten *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutantenbibliothek

Der Aufbau einer genotypisch charakterisierten Mutantenbibliothek von *P. putida* KT2440 wurde begonnen, um die funktionelle Analyse des Bakteriums zu erleichtern. Ein schneller Zugriff auf bereits genotypisch charakterisierte Mutanten wird ermöglicht, was u. a. für die Aufklärung metabolischer Netzwerke unerlässlich ist. Die Identifizierung der transposonflankierenden DNA-Region ergab bisher 353 Integrationsorte in 159 verschiedene Gene, in vier rDNA-Gene und in zwei nicht kodierende Bereiche, d. h. zwischen zwei ORFs (s. Tab. 3.1-3.2, Tab. 3.4-3.5; Tab. 7.1-7.2). Hier wurden die genotypisch charakterisierten Mutanten (Beginn der Sequenzierung der konservierten *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten zum Aufbau einer Mutantenbank) sowie die in folgenden Kapiteln genotypisch und phänotypisch beschriebenen Klone (auxotrophe Mutanten, Siderophordefekt- und Biofilmdefektmutanten) berücksichtigt.

In Tabelle 3.1 wurde die transposonflankierende DNA-Region der Mutanten (in den Mikrotiterplatten 1-3 und 29 konservierte Mutanten; ausgenommen die auxotrophen Mutanten, Siderophordefekt- und Biofilmdefektmutanten) gemäß der TIGR-Annotation (s. dazu 3.1.3) ihrer Funktion/zellulären Aufgabe zugeordnet und zusammengestellt.

Tab. 3.1 Transposonflankierende DNA-Region genotypisch charakterisierter Mutanten (in den Mikrotiterplatten 1-3 und 29 konservierte Mutanten)

Funktion/ zelluläre Aufgabe	Integra- tionen (insgesamt)	Unterschied- liche Gene	Integration in unterschiedliche Gene (%)	Theoretische Verteilung der Gene* (%)
Aminosäurebiosynthese	4	4	4,76	2,16
Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen, etc.	16	3	3,57	2,57
Zellhülle ("Cell envelope")	32	6	7,14	5,58
Zelluläre Prozesse	20	5	5,95	6,14
Zentraler Metabolismus	2	1	1,19	1,34
DNA Metabolismus	3	2	2,38	2,01
Energiemetabolismus	39	17	20,24	7,81
Hypothetische Proteine	30	14	16,67	27,60
Proteinveränderung ("Protein fate")	5	4	4,76	3,07
Proteinbiosynthese	2	2	2,38	2,25
Purine, Pyrimidine, etc.	1	1	1,19	1,10
Regulatorische Funktionen	22	9	10,71	9,13
Transkription	1	1	1,19	1,12
Transport - und Bindeproteine	9	5	5,95	11,20
Unbekannte Funktion	24	11	13,10	8,68
Unterbrochene Leserahmen	--	--	--	0,46

Funktion/ zelluläre Aufgabe	Integra- tionen (insgesamt)	Unterschied- liche Gene	Integration in unterschiedliche Gene (%)	Theoretische Verteilung der Gene* (%)
Fettsäure-und Phospholipide	--	--	--	1,91
Andere Kategorien	--	--	--	3,14
Signaltransduktion	--	--	--	2,38
rDNA	4	----	---	
	215	84		

* <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePieChart.spl?db=gpp>

Der prozentuale Anteil der bisher identifizierten Tn5-Integrationen in unterschiedliche Gene von KT2440 spiegelte die prozentuale theoretische Verteilung gut wieder. Unterrepräsentiert waren Integrationen in Gene, die für Transport- und Bindeproteine kodieren sowie in Gene, deren Proteine als hypothetisch annotiert wurden (s. Tab. 3.1 blaue Schrift). Einen höheren prozentualen Anteil machten Gene des Energiemetabolismus sowie Gene mit bisher unbekannter Funktionszuordnung aus (s. Tab. 3.1 rote Schrift) aus. In vier Kategorien (unterbrochene Leserahmen, Fettsäure- und Phospholipidmetabolismus, Signaltransduktion sowie andere Funktionen: z. B.: phagenassoziierte Gene) wurden bisher keine Transposonintegrationen identifiziert.

3.1.6 Screening nach auxotrophen Mutanten

Das Screening nach auxotrophen *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten erfolgte auf Minimalmedium mit Acetat als Kohlenstoffquelle. Hierfür wurden die konservierten *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten parallel auf Minimalmedium mit Acetat und EM-Vollmedium gestempelt und das Wachstum mit dem des Wildtyps verglichen. Die potentiell auxotrophen Mutanten, wurden erneut überprüft. Auf diese Weise wurden 122 von 3500 Mutanten erhalten, die auf dem Minimalmedium keine Koloniebildung zeigten und vermutlich einen Defekt im zentralen Metabolismus sowie im Energie- und Aminosäurestoffwechsel aufwiesen.

Alle Mutanten mit auxotrophen Phänotyp (AUX) wurden analysiert und die Transposonintegrationsstelle bestimmt (s. Tab. 7.1). In der Tabelle 3.2 wurden nur die auxotrophen Mutanten mit unterschiedlicher Transposonintegration im *P. putida* KT2440-Genom aufgelistet.

Tab. 3.2 Identifizierung der transposonflankierenden Region auxotropher *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)- Mutanten

Klon [*]	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom (function) ⁺	Genomlokalisierung (locus name) ⁺	Gen (gene symbol) ⁺	E.C. #
AUX014	Tryptophan synthase beta chain ¹	PP0083	<i>trpB</i>	4.2.1.20
AUX102	Anthranilate synthase component I ¹	PP0417	<i>trpE</i>	4.1.3.27
AUX006	Homoserine dehydrogenase ²	PP1470	<i>hom</i>	1.1.1.3
AUX053	Threonine synthase ²	PP1471	<i>thrC</i>	4.2.99.2
AUX056	O-succinylhomoserine sulphydrylase ²	PP2001	<i>metZ</i>	4.2.99.-
AUX041	Dihydrodipicolinate reductase ²	PP4725	<i>dapB</i>	1.3.1.26
AUX003	Homoserine O-acetyltransferase ²	PP5097	<i>metX</i>	2.3.1.31
AUX057	Argininosuccinate lyase ³	PP0184	<i>argH</i>	4.3.2.1
AUX040	Argininosuccinate synthase ³	PP1088	<i>argG</i>	6.3.4.5
AUX025	N-acetylglutamate synthase ³	PP5185	<i>argA</i>	2.3.1.1
AUX073	Acetylglutamate kinase ³	PP5289	<i>argB</i>	2.7.2.8
AUX045	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase ⁴	PP0289	<i>hisB</i>	4.2.1.19
AUX071	Glutamine amidotransferase ⁴	PP0290	<i>hisH</i>	2.4.2.-
AUX019	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase ⁴	PP0292	<i>hisA</i>	5.3.1.16
AUX010	Imidazoleglycerol-phosphate synthase, cyclase subunit ⁴	PP0293	<i>hisF</i>	—
AUX016	ATP-phosphoribosyltransferase ⁴	PP0965	<i>hisG</i>	2.4.2.17
AUX070	Histidinol dehydrogenase ⁴	PP0966	<i>hisD</i>	1.1.1.23
AUX017	Histidinol-phosphate aminotransferase ⁴	PP0967	<i>hisC</i>	2.6.1.9
AUX052	2-isopropylmalate synthase ⁵	PP1025	<i>leuA</i>	4.1.3.12
AUX002	Ketol-acid-Reductoisomerase ⁵	PP4678	<i>ilvC</i>	1.1.1.86
AUX075	Acetolactate synthase, small subunit ⁵	PP4679	<i>ilvN</i>	4.1.3.18
AUX044	Acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type ⁵	PP4680	<i>ilvB</i>	4.1.3.18
AUX059	Dihydroxy-acid dehydratase ⁵	PP5128	<i>ilvD</i>	4.2.1.9
AUX048	3-phosphoserine aminotransferase ^{6/A}	PP1768	<i>serC</i>	2.6.1.52
AUX012	Phosphoserine phosphatase ⁶	PP4909	<i>serB</i>	3.1.3.3
AUX027	D-3 phosphoglycerate dehydrogenase ⁶	PP5155	<i>serA</i>	1.1.1.95
AUX022	Phosphoribosylformylglycinamide synthase ⁷	PP1037	<i>purL</i>	6.3.5.3
AUX005	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase ⁷	PP1665	<i>purM</i>	6.3.3.1
AUX021	Amidophosphoribosyltransferase ⁷	PP2000	<i>purF</i>	2.4.2.14
AUX023	Phosphoribosylamine-glycine ligase ⁷	PP4823	<i>purD</i>	6.3.4.13
AUX082	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit ⁷	PP5335	<i>purK</i>	4.1.1.21
AUX108	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit ⁷	PP5336	<i>purE</i>	4.1.1.21
AUX124	Dihydroorotase, homodimeric type ⁸	PP1086	<i>pyrC</i>	3.5.2.3
AUX121	Orotidine 5-phosphate decarboxylase ⁸	PP1815	<i>pyrF</i>	4.1.1.23
AUX038	Carbamoyl-phosphate synthase, large subunit ⁸	PP4723	<i>carB</i>	6.3.5.5
AUX018	Carbamoyl-phosphatesynthase, small chain ⁸	PP4724	<i>carA</i>	6.3.5.5
AUX113	Aspartate carbamoyltransferase ⁸	PP4998	<i>pyrB</i>	2.1.3.2
AUX030	Orotate phosphoribosyltransferase ⁸	PP5291	<i>pyrE</i>	2.4.2.10
AUX078	Adenosylhomocysteinase authentic frameshift ⁹	PP4976	<i>ahcY</i>	2.4.2.19

Klon *	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom (function) ⁺	Genomlokalisierung (locus name) ⁺	Gen (gene symbol) ⁺	E.C. #
AUX094	Enolase ¹⁰	PP1612	<i>eno</i>	4.2.1.11
AUX037	Triosephosphate isomerase ¹⁰	PP4715	<i>tpiA</i>	5.3.1.1
AUX031	Malate:quinone oxidoreductase ¹¹	PP0751	<i>mgo-1</i>	1.1.99.16
AUX120	Fumarate hydratase, class I ¹¹	PP0897	—	4.2.1.2
AUX058	2-oxoglutarate dehydrogenase, dihydrolipoamide succinyltransferase ¹¹	PP4188	<i>kgdB</i>	2.3.1.61
AUX008	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component ¹¹	PP4189	<i>kgdA</i>	1.2.4.2
AUX109	Succinate dehydrogenase, flavoprotein ¹¹	PP4191	<i>sdhA</i>	1.3.99.1
AUX034	Succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein ¹¹	PP4192	<i>sdhD</i>	—
AUX112	Succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit ¹¹	PP4193	<i>sdhC</i>	—
AUX009	Citrate synthase ¹¹	PP4194	<i>gltA</i>	4.1.3.7
AUX029	Lipoic acid synthetase ¹³	PP4800	<i>lipA</i>	—
AUX028	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase ¹⁴	PP4699	<i>panB</i>	2.1.2.11
AUX074	Pantotate-β-alanine-ligase ¹⁴	PP4700	<i>panC</i>	6.3.2.1
AUX032	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase ¹⁵	PP0787	<i>nadC</i>	2.4.2.19
AUX042	Phosphomethylpyrimidine kinase ¹⁶	PP4782	<i>thiD</i>	2.7.4.7
AUX067	Sulfite reductase hemoproteine, β-subunit ¹⁷	PP2371	<i>cysI</i>	1.8.12
AUX068	C4-type zinc finger protein, DksA/Tra family ¹⁸	PP4693	<i>dksA</i>	—
AUX064	Histidyl-tRNA synthetase, putative ¹⁹	PP4890	—	—
AUX122	Lipoate-protein ligase B ²⁰	PP4801	<i>lipB</i>	—
AUX001	Aminotransferase, class I ²¹	PP0817	—	—
AUX079	Flagellar biosynthetic protein FliQ ²²	PP4354	—	—

* interne Klonbezeichnung

E.C. #: Enzyme commission number

⁺ offizielle Bezeichnung von TIGR

— keine Angabe

Aminosäurebiosynthese ¹ Aromatische Aminosäure Familie ² Aspartat Familie ³ Glutamat Familie ⁴ Histidin Familie ⁵ Pyruvat Familie ⁶ Serin Familie	Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern ¹³ Lipoat ¹⁴ Pantothenat und Coenzym A ¹⁵ Pyrimidinnukleotide ¹⁶ Thiamin ^A Pyridoxin
Purine, Pyrimidine, Nukleoside und Nukleotide ⁷ Purinribonukleotid Biosynthese ⁸ Pyrimidinribonukleotid Biosynthese	Zentraler Intermediärstoffwechsel ¹⁷ Schwefelmetabolismus
Energiemetabolismus ⁹ Aminosäuren und Amine ¹⁰ Glykolyse/Glukoneogenese ¹¹ TCA Zyklus ¹² Zucker	Proteinsynthese ¹⁹ tRNA Aminoacylierung
Unbekannte Funktion ²¹ Enzyme mit unbekannter Spezifität	Proteinveränderung ("Protein fate") ²⁰ Proteinmodifizierung und -reparatur
	Zelluläre Prozesse: ²² Chemotaxis und Beweglichkeit

Insgesamt wurden 61 verschiedene Genorte identifiziert, bei denen die Transposonintegration das auxotrophe Wachstum des Organismus verhinderte und eine Integration zwischen zwei ORFs (s. Tab.7.1). Die Kategorisierung der Gene (s. dazu

3.1.3) gemäß ihrer Funktion/zellulären Aufgabe (z. B. Aminosäurebiosynthese, Energiestoffwechsel, etc.) wurde in einer Legende unter der Tabelle 3.2 dargestellt.

Die größte Anzahl der Mutanten (26) wies Defekte in der Aminosäurebiosynthese auf, wobei sieben der zehn Gene des Histidinmetabolismus (*his*-Gene) aus *P. putida* KT2440 betroffen waren. Weitere 12 bzw. 11 Tn5-Integrationen, die zu einem auxotrophen Phänotyp in den jeweiligen Mutanten führten, befanden sich in Genen der Nukleinsäurebiosynthese sowie Genen des Energiestoffwechsels. Betroffen waren aber auch Gene, die bei der Bildung von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern wichtig waren (fünf Mutanten). Weitere vier Mutanten waren in Genen defekt, die eine regulatorische Funktion in der Zelle (AUX068) und im zentralen Intermediärstoffwechsel (AUX067) haben sowie eine Rolle bei der Proteinbiosynthese (AUX064) bzw. der Proteinmodifikation (AUX122) spielen. Des weiteren fand sich eine Mutation in einem Gen, dessen Protein eine bis jetzt unbekannte Enzymspezifität aufweist (AUX001) und eine Mutation in einem Protein, das am Geißelaufbau der Zelle beteiligt ist (AUX079).

3.1.6.1 Auxotrophe Mutanten mit Integration in die Gene der Untereinheiten der Carbamoylphosphatsynthase

Von den 122 auxotrophen Mutanten wurden neun bzw. sechs Mutanten mit einer Transposonintegration im *carA*- bzw. *carB*-Gen gefunden, was eine Häufung darstellte. Aus diesem Grund wurden die Mutanten genauer analysiert und die jeweiligen Positionen der Kanamycinresistenzgenkassetten in den *car*-Genen ermittelt, um festzustellen, ob es sich um eine sequenzspezifische Integration des EZ::TNTM <Kan-2> TransposonTM handelte.

Die Gene *carA* und *carB* kodieren für die kleine und große Untereinheit der Carbamoylphosphatsynthase, die am Pyrimidin- und Glutaminsäurestoffwechsel beteiligt ist. Sie katalysiert die Synthese von Carbamoylphosphat (CAP) und ist ein wichtiger Stickstoffatomüberträger bei der Pyrimidin- und Argininsynthese. Das *carA*-Gen (GC-Gehalt: 63,76 %), das für die kleine Untereinheit kodiert, hat eine Größe von 1,134 kb und umfasst die Koordinaten 5'-5371967 – 5372034-3' im *P. putida* KT2440 Genom. Das *carB*-Gen (GC-Gehalt: 61,71%) ist 3,228 kb groß und umfasst die Koordinaten im Genom von 5'-5371934 – 5368707-3'. In der Tabelle 3.3 wurden die Mutanten mit Transposonintegration in die *carA/B*-Gene dargestellt. Die Koordinaten geben die Integrationspositionen im Bakteriengenom wieder.

Tab. 3.3 Integrationsposition der Kanamycinresistenzgenkassette der AUX-Klone in die Gene der Untereinheiten der Carbamoylphosphatsynthase

<i>CarA</i> : 5'-5373167 – 5372034-3'			<i>CarB</i> : 5'-5371934 – 5368707-3'		
Klon	Koordinate	Abstand (bp) zur nachfolg. Integration	Klon	Koordinate	Abstand (bp) zur nachfolg. Integration
AUX 015	5373289	409	AUX 104	5371778	320
AUX 111	5372880	27	AUX 038	5371458	348
AUX 103	5372853	150	AUX 118	5371110	655
AUX 093	5372703	278	AUX 115	5370710	255
AUX 043	5372425	229	AUX 049	5370455	1582
AUX 018	5372196	55	AUX 092	5368873	169
AUX 007	5372141	25			
AUX 055	5372116	40			
AUX 086	5372076	45			

Die Integration des Kanamycinresistenzgens erfolgte sowohl im *carA*- als auch im *carB*-Gen an verschiedenen Positionen (s. Tab. 3.3), daher gab es keine Hinweise auf eine sequenzspezifische Integration. Die GC-Gehalte mit 63,76 % (*carA*) und 61,71 % (*carB*) wichen ebenfalls vom durchschnittlichen GC-Gehalt des Organismus mit 61,6 % (Nelson *et al.*, 2002) nicht wesentlich ab, was ebenfalls ein Grund für die häufige Integration hätte sein können.

3.1.7 Screening nach Siderophordefektmutanten

Die Fähigkeit von *P. putida* KT2440 unter eisenlimitierten Bedingungen zu wachsen, ist essentiell für das Überleben in der Umwelt. Bei Eisenmangel kommt es bei *P. putida* KT2440 sowie anderen Pseudomonaden zur Ausschüttung von eisenbindenden Chelatoren (Siderophoren), insbesondere von Chromopeptiden, den Pyoverdinen, die eine hohe Affinität zu Eisen(III)ionen haben (Budzikiewicz, 1993; 1997; Meyer, 2000). Auf diese Weise wird eine ausreichende Versorgung mit Eisen gewährleistet. Jede Spezies produziert für sie charakteristische Pyoverdine, die aus einer variablen Peptidkette mit Seitenketten sowie einer konservierten chromophoren Gruppe bestehen (Budzikiewicz, 1993; 1997; Meyer, 2000).

Die fluoreszierende Eigenschaft der Pyoverdine unter UV-Licht erlaubte den Testaufbau für das Screening nach Mutanten, die unter Eisenlimitierung keine Pyoverdine produzierten und/oder ins Medium ausschieden (s. 2.8.3). Für das Screening

der Mutanten wurde die Fluoreszenz unter UV-Licht im zellfreien Überstand (s. Abb. 3.2) und der Zellen überprüft (s. Abb. 3.4) und mit der des Wildtyps verglichen.

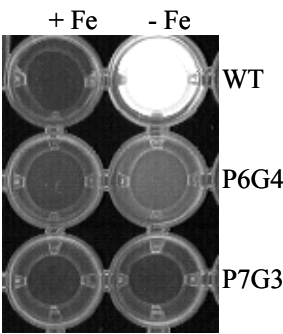


Abb. 3.2 Zellfreie Kulturüberstände von *P. putida* KT2440 (WT) und verschiedener Mutanten unter UV-Licht

Zellfreie Kulturüberstände von *P. putida* KT2440 (WT), einer unter Eisenlimitierung nicht-fluoreszierenden Mutante (P7G3) und einer Mutanten mit abgeschwächter Fluoreszenz (P6G4) unter UV-Licht $\lambda_{312\text{ nm}}$. Die Kulturen wurden in Low phosphat Medium (+/- 36 μM FeSO_4 , 10 mM Glucose) bei 30 °C für 16 h inkubiert.

Insgesamt sieben der 3500 getesteten Mutanten zeigten unter eisenlimitierten Bedingungen einen gegenüber dem Wildtyp (WT) auffälligen Phänotyp. Das Tn5 integrierte in unterschiedliche Gene und die korrespondierenden Genprodukte wurden gemäß der TIGR-Annotation (s. dazu 3.1.3) den verschiedenen Funktionen/zellulären Aufgaben zugeordnet (s. Tab. 3.4).

Tab 3.4 Phänotypische und genetische Charakterisierung der Siderophordefektmutanten

Klon	Phänotyp		Genom- lokus	Transposonflankierende DNA-Region	Funktion/ Zelluläre Aufgabe
	Zellfreier Überstand	Zellen			
P6G4	-	-	PP0518	N utilization substance protein b (<i>nusB</i>)	Transkriptionsfaktor
P24E1	-	-	PP4322	Cytochrome c-type biogenesis protein CcmF	Energiemetabolismus: Elektronentransport
P12B11	--	-	PP4223	Diamino butyrate-2-oxo- glutarate transaminase	Zentraler Intermediärstoff- wechsel
P25E7	--	-	PP4245	Siderophore biosynthesis protein, putative	Transport- und Binde- proteine: Kationen
			PP4246	Periplasmic binding protein	
P7G3	--	--	PP4730	Ferric uptake regulator (<i>fur</i>)	Regulatorische Funktion: DNA-Interaktionen
P18F11	--	--	PP4243	Pyoverdine synthetase	Proteinsynthese
P27A5	--	--	PP4219	Non ribosomal siderophore peptide synthetase (<i>ppsD</i>)	Zelluläre Prozesse: Toxin- produktion und Resistenz

- - keine Fluoreszenz im Vergleich zum WT abgeschwächte Fluoreszenz im Vergleich zum WT

Im zellfreien Kulturüberstand zeigten zwei der sieben Mutanten unter Eisenlimitierung eine gegenüber dem Wildtypstamm abgeschwächte Fluoreszenz (s. Abb. 3.2). Die in den Mutanten betroffenen Gene kodierten für Proteine, die bei der DNA-Transkription (PP0518; Stamm P6G4) und im Energiestoffwechsel beim Elektronentransport eine Rolle spielen (PP4322; Stamm P24E1). Die Tn5-Integration in das Cytochrom C-Typ Biogenese Protein CcmF (PP4322) führte ebenfalls dazu, dass eine Übernachtkultur dieses Stammes (P24E1) im visuellen Licht sowohl unter Eisenlimitierung also auch mit ausreichender Eisenversorgung eine gelb-grüne Färbung zeigte, die der Wildtyp nur unter Eisenmangel aufwies (s. Abb. 3.3). Weiterhin war dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Mutanten Cytochromoxidase-negativ (s. 2.2.7).

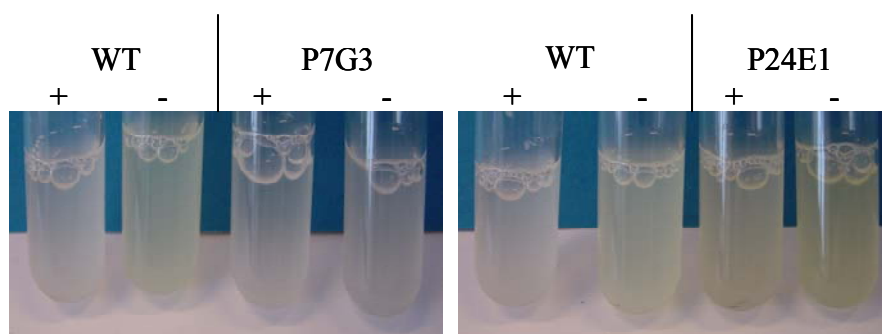


Abb. 3.3 Übernachtkulturen von *P. putida* KT2440 (WT) und den Mutanten P7G3 und P24E1 in Low phosphat Medium (+/- 36 μ M FeSO₄, 10 mM Glucose)

Die Wildtypkultur zeigte unter Eisenlimitierung (-) eine grün-gelbe Färbung, bedingt durch die Pyoverdinausschüttung ins Medium. Die Mutante P7G3 wies diesen Unterschied nicht auf, bei der Mutante P24E1 war auch unter Eisenkomplementierung (+) eine grün-gelbe Färbung erkennbar.

Bei fünf Mutanten wurde keine Fluoreszenz unter UV-Licht im zellfreien Kulturüberstand im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Zwei dieser Klone (P18F11/P27A5) zeigten Mutationen in Genen, die *P. putida* KT2440 für die Synthese eisenbindender Proteine zur Verfügung stehen; einer Pyoverdinsynthetase (PP4243) und einer nicht-ribosomalen Siderophorpeptidsynthetase (PP4219). In der Mutante P25E7 integrierte die Kanamycinresistenzgenkassette zwischen zwei ORFs. Die Gene kodieren für ein putatives Siderophorbiosyntheseprotein (PP4245) und ein periplasmatisches Bindeprotein (PP4246), die beide zur Gruppe der Transport- und Bindeproteine gehören. Weiterhin war ein Stamm (P12B11) in einem Transaminasegen mutiert, dessen korrespondierendes Protein am zentralen Intermediärstoffwechsel beteiligt ist (PP4223). Der Klon P7G3 zeigte eine Mutation im "ferric uptake regulator" (PP4730) dem globalen Regulatorgen für die eisenregulatorischen Zellprozesse.

Bei mikroskopischer Betrachtung der unter Eisenlimitierung gewachsenen Kulturen zeigten die Zellen der Mutanten P7G3 (Fur), P18F11 (Pyoverdinsynthetase) und P27A5 (nicht-ribosomale Siderophorpeptidsynthetase) im Vergleich zu den Wildtypzellen keine

Fluoreszenz unter UV-Licht. Im Vergleich dazu fluoreszierten die Zellen der übrigen Mutanten schwächer als die des Wildtyps (s. Abb. 3.4).

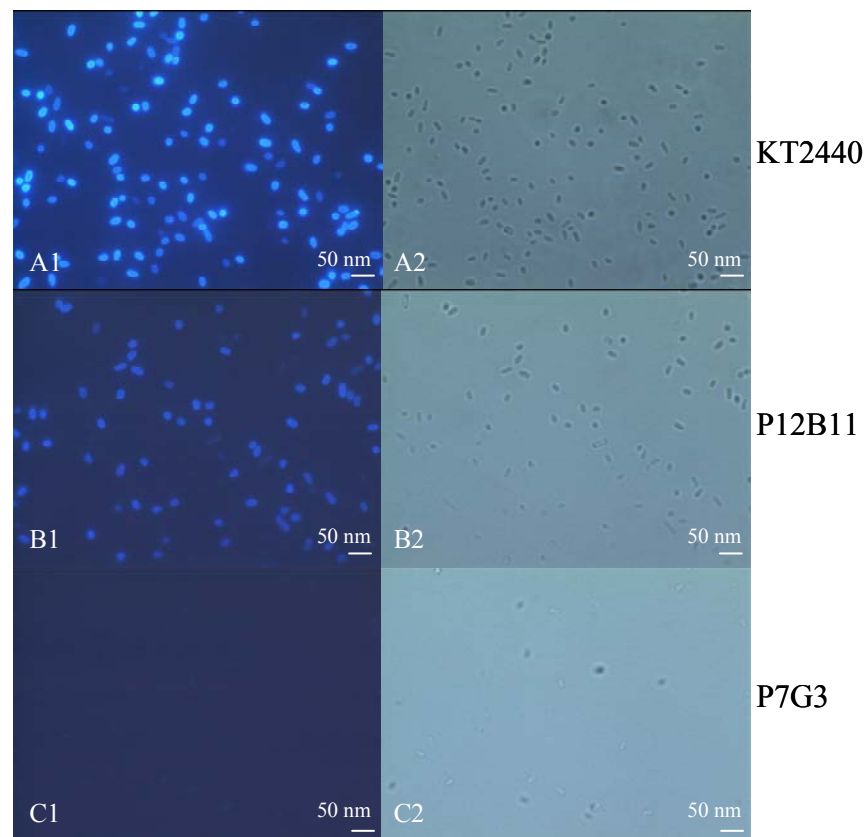


Abb. 3.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Zellen des Wildtypstamms (A) und ausgewählter Mutanten (B und C) nach Wachstum unter eisenlimitierten Bedingungen unter UV-Licht (1) und im korrespondierenden Hellfeld (2)

Die Zellen der Mutante P12B11 (B1) zeigten gegenüber den Wildtypzellen (A1) eine abgeschwächte Fluoreszenz. Die Zellen der *fur*-Mutante P7G3 (C1) fluoreszierten nicht (Vergrößerung: 1000-fach; 50 nm —).

3.1.7.1 Oxidative Stressantwort der Siderophordefektmutanten

Aufgrund der genetischen Analyse der Siderophordefektmutanten wurde vermutet, dass ein Teil der Mutanten wie z. B. die *fur*-Mutante P7G3 auch auf oxidativen Stress reagierte. In *P. aeruginosa* steht Fur in Zusammenhang mit der Regulation der Gene (z. B. Katalase, Superoxiddismutase), die dem Organismus zur Detoxifizierung zur Verfügung stehen (Hassett *et al.*, 1996; Vasil *et al.* 1999).

Für das Screening wurden jeweils 10 µl einer Übernachtskultur auf Agarplatten mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxidkonzentrationen gegeben, für 16 Stunden inkubiert und der Phänotyp mit dem des Wildtyps verglichen (s. 2.8.4, s. Abb. 3.5).

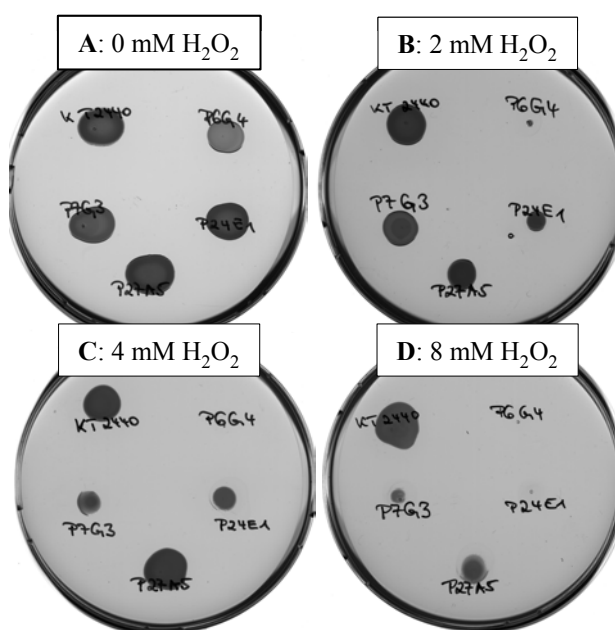


Abb. 3.5 Wachstum von Mutanten auf LB-Agar mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid im Vergleich zum Wildtyp

Die toxische Wirkung von Wasserstoffperoxid zeigte sich bei den Mutanten P6G4, P7G3, P24E1 und P27A5 anhand eines verminderten Wachstums gegenüber dem Wildtyp. A: normales Wachstum auf LB-Agar, B: vermindertes Wachstum der Kulturen P6G4 und P24E1 auf LB-Agar mit Wasserstoffperoxid ($c(\text{H}_2\text{O}_2) \sim 2\text{mM}$). C: vermindertes Wachstum der Kulturen P6G4, P7G3 und P24E1 auf LB-Agar mit Wasserstoffperoxid ($c(\text{H}_2\text{O}_2) \sim 4\text{mM}$). D: vermindertes Wachstum der Kulturen P6G4, P7G3, P24E1 und P27A5 auf LB-Agar mit Wasserstoffperoxid ($c(\text{H}_2\text{O}_2) \sim 8\text{mM}$).

Vier der sieben Siderophordefektmutanten reagierten auf den durch Wasserstoffperoxid ausgelösten oxidativen Stress mit vermindertem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Am deutlichsten fiel die oxidative Stressantwort bei den Klonen P6G4 und P24E1 aus (s. Abb. 3.5, Tab. 3.4). Diese Kulturen zeigten bereits bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von ca. 2 mM im LB-Agar vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die Reaktionsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress wurde bei den Klonen P7G3 und P27A5 erst bei höheren Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 4 mM bzw. 8 mM herabgesetzt.

Durch die jeweilige Mutation in dem *nusB* (Klon P6G4), in einem C-Typ Cytochrom-Synthesegen (Klon P24E1), in dem *fur* (Klon P7G3) sowie in einem Siderophorpeptidsynthetasegen (Klon P27A5) wurde demnach nicht nur die Fähigkeit zur Pyoverdinsynthese und/oder -ausscheidung beeinflusst, sondern auch die Reaktionsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress herabgesetzt.

3.1.8 Screening nach Defektmutanten in der Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen

Die Fähigkeit von Zellen, sich an Oberflächen zu heften, ist u. a. die Voraussetzung zur Bildung von Biofilmen und Kolonisierung von Pflanzenwurzeln. Ziel dieses Screenings war es durch eine schnelle und einfache Methode Gene zu identifizieren, die für die Fähigkeit zur Adhäsion an Oberflächen und daraus folgender Biofilmbildung kodieren. Hierzu wurde ein Testsystem gewählt, in dem zunächst die Fähigkeit des Wildtyps zur Biofilmbildung in Mikrotiterplatten aus Polystyrol in Abhängigkeit verschiedener Medien untersucht wurde (O'Toole und Kolter, 1998 a). Der Versuch wurde in drei unabhängigen Versuchsansätzen in 8 Parallelbestimmungen durchgeführt (s. 2.8.2, Abb. 3.6 und Abb. 3.7).

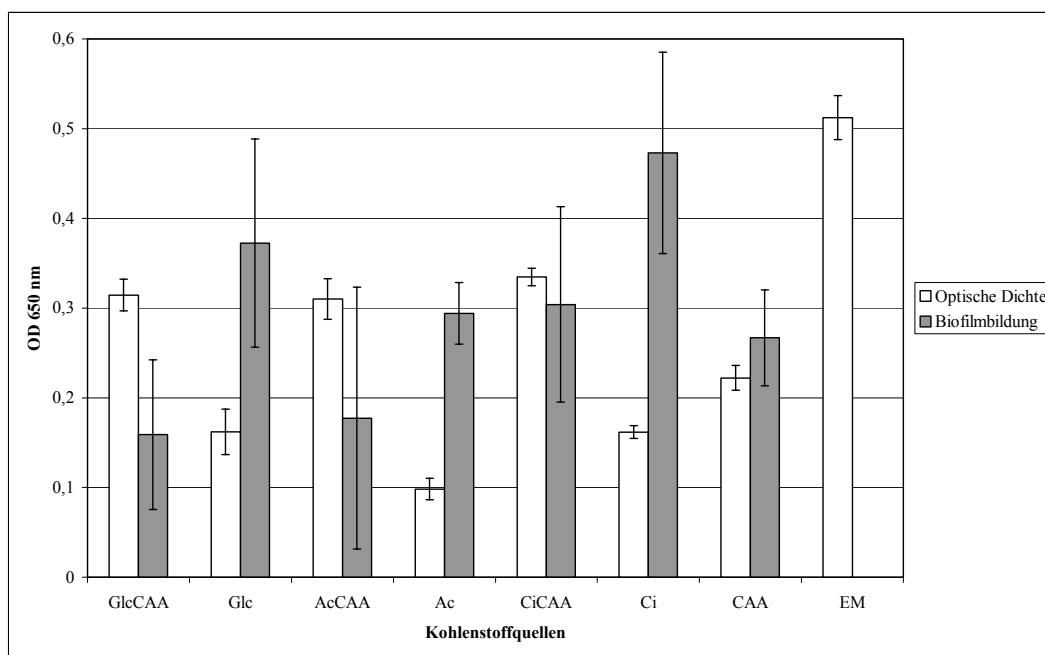


Abb. 3.6 Optische Dichte und Biofilmbildung von *P. putida* KT2440 in Mikrotiterplatten nach vier Stunden

Der Wildtypstamm wurde in Mikrotiterplatten aus Polystyrol in Minimalmedium (MM) mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen bei 30 °C für vier Stunden stehend inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte gemessen und die Biofilmbildung anhand eines unlöslichen Kristallviolett-komplexes quantifiziert, der sich an der Grenzfläche zwischen Luft und Medium bildet. (GlcCAA: 10 mM Glucose 0,2 % Casamino acids; Glc: 10 mM Glucose, AcCAA: 20 mM Acetat + 0,2 % Casamino acids, Ac: + 20 mM Acetat, CiCAA: 0,2 % Citrat + 0,2 % Casamino acids, Ci: 0,2 % Citrat, CAA: 0,2 % Casamino acids; EM: mod. LB-Medium).

Nach vierstündiger Inkubation von *P. putida* KT2440 in Mikrotiterplatten wurde die optische Dichte der Kulturen und die Biofilmbildung an der Oberfläche der Mikrotiterplatte wie unter 2.8.2 beschrieben bestimmt.

Wildtypzellen, die mit "Casamino acids" wuchsen, erreichten eine optische Dichte_(OD 650) von 0,3. Bei Zellen, die ohne "Casamino acids" inkubiert wurden, lag die optische Dichte_(OD 650) zwischen 0,1 (bei Acetat), 0,15 (Glucose und Citrat) und 0,55 (EM). Der von den Zellen gebildete Biofilm unterschied sich in Abhängigkeit des Mediums. Bei Zellen, die mit "Casamino acids" wuchsen, fiel dieser geringer aus als bei den jeweiligen Kulturen, die ohne "Casamino acids" inkubiert wurden. Die in Vollmedium inkubierte *P. putida* KT2440-Kultur zeigte hingegen nach vierstündiger Inkubation keinen detektierbaren Biofilm.

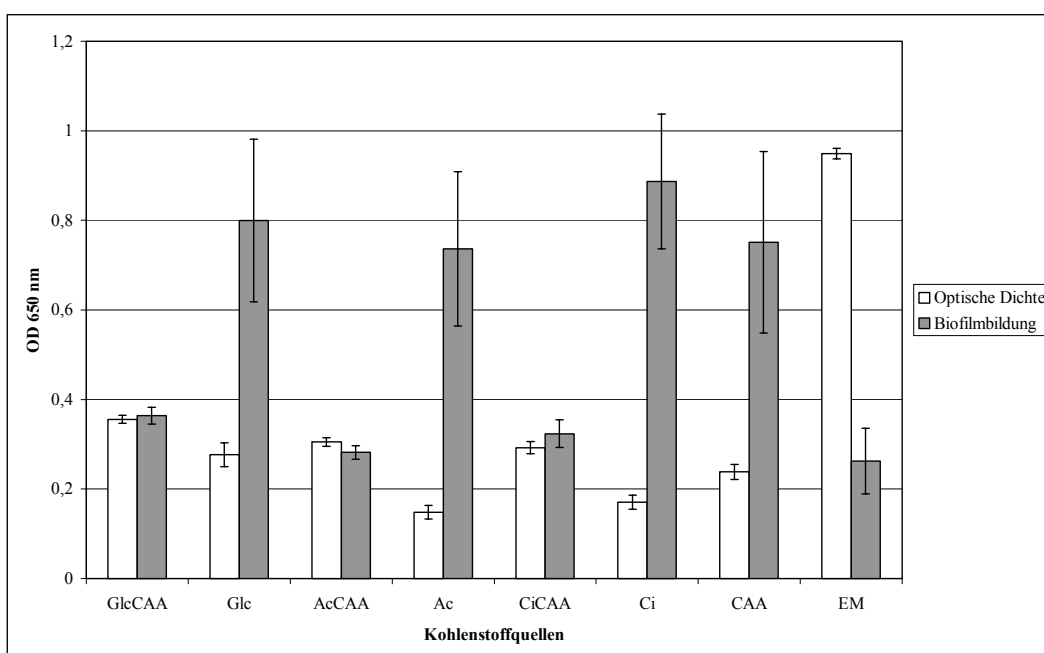


Abb. 3.7 Optische Dichte und Biofilmbildung von *P. putida* KT2440 in Mikrotiterplatten nach 16 Stunden

Der Wildtypstamm wurde in Mikrotiterplatten aus Polystyrol in Minimalmedium (MM) mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen bei 30 °C für 16 Stunden stehend inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte gemessen und die Biofilmbildung anhand eines unlöslichen Kristallviolettkomplexes quantifiziert, der sich an der Grenzfläche zwischen Luft und Medium bildete. (GlcCAA: 10 mM Glucose + 0,2 % Casamino acids; Glc: 10 mM Glucose, AcCAA: 20 mM Acetat + 0,2 % Casamino acids, Ac: 20 mM Acetat, CiCAA: 0,2 % Citrat + 0,2 % Casamino acids, Ci: 0,2 % Citrat, CAA: 0,2 % Casamino acids, EM: mod. LB-Medium).

Nach sechzehnständiger Inkubation von *P. putida* KT2440-Zellen in Mikrotiterplatten. betrugen die optischen Dichten_(OD 650) bei Zellen mit Zusatz von "Casamino acids" zwischen 0,3 und 0,4 und lagen damit ähnlich hoch wie nach vierstündiger Inkubation. Die Kulturen, die ohne diesen Zusatz inkubiert wurden, erreichten optische Dichten_(OD 650) zwischen 0,15 (bei Acetat und Citrat) und 0,3 (Glucose).

Der Biofilm an der Oberfläche der Mikrotiterplatten nahm bei allen Kulturen im Vergleich zur vierstündigen Inkubation zu, war jedoch bei Zellen mit "Casamino acids"

geringer als bei Kulturen, die ohne diesen Zusatz inkubiert wurden. Stämme, die mit Glucose, Acetat sowie Citrat wuchsen, steigerten die Biofilmbildung um das jeweils doppelte. Eine Ausnahme bildeten die Zellen, denen nur "Casamino acids" als Kohlenstoff- und Energiequelle zur Verfügung stand. Hier wurde bei gleicher optischer Dichte eine dreifache Erhöhung der Biofilmbildung mit steigender Inkubationszeit ermittelt. In Vollmedium inkubierte Zellen zeigten nach 16 Stunden ebenfalls einen meßbaren Biofilm.

Da somit gezeigt werden konnte, dass *P. putida* KT2440 in Abhängigkeit des Mediums unterschiedlich starke Biofilme in den verwendeten Mikrotiterplatten bildete, wurden nun die generierten *P. putida* KT2440-Mutanten auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung an abiotischen Oberflächen untersucht und mit der des Wildtyps verglichen. Dieses Experiment diente der Vorselektion möglicher Mutanten, die nachfolgend in einem Kolonisierungsexperiment mit Weizenwurzeln in Konkurrenz zum Wildtyp untersucht werden sollten, um die Auswirkung der Mutation im biotischen System feststellen zu können (s. 3.1.10).

Die Mutanten wurden in Minimalmedium mit Glucose bei 30°C über Nacht inkubiert, die optische Dichte_(OD 650) sowie die Biofilmbildung bestimmt und im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Bei der Auswertung wurden nur Kulturen berücksichtigt, deren optische Dichte_(OD 650) > 0,2 war. Auffällige Mutanten wurden erneut gescreent, um das Ergebnis zu verifizieren. Aus 3500 Mutanten wurden 10 in der Biofilmbildung gegenüber dem Wildtyp veränderte Mutanten identifiziert und die Transposonintegrationsorte bestimmt (s. Tab. 3.5). Nach weiterer Verifizierung der Ergebnisse zeigte sich, dass zwei Mutanten (schwarze Umrandung) mit 20 % Unterschied zum Wildtyp schlechter und eine Mutante besser (grau) als der Wildtyp an der Oberfläche der Mikrotiterplatten Biofilme bildeten; bei den anderen Mutanten betrug dieser Unterschied 10 %.

Tab. 3.5 Mutanten mit veränderter Biofilmbildung in Polystyrolmikrotiterplatten gegenüber dem Wildtyp

Klon	Transposonflankierende DNA-Region	Lokus	Funktion/zelluläre Aufgabe
14G4	Coenzyme PQQ synthesis protein B (<i>pqqB</i>)	PP0379	Biosynthese von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen und Carriern: Menaquinone + Ubiquinone
28D3	ATP-dependent RNA helicase, DEAD box family	PP1868	Transkription: Transkriptionsfaktoren
23B6	Flagellar motor switch protein FliG	PP4368	Zelluläre Prozesse: Chemotaxis und Beweglichkeit
28F5	Bacterioferritin-associated ferredoxin, putative	PP1083	Energiemetabolismus: Elektronentransport
28E5	Rubredoxin reductase	PP5314	Energiemetabolismus: Elektronentransport
34F5	Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, (<i>zca</i> -like permease protein)	PP0043	Transport- und Bindeproteine: Kationen
32C8	ABC transporter, ATP-binding protein	PP0674	Transport- und Bindeproteine: Unbekannte Substrate
7F9	Phosphat transport system regulator protein PhoU (<i>phoU</i>)	PP5325	Regulatorische Funktion
1G7	Surface adhesion protein, putative	PP0806	Zelluläre Prozesse: Adhäsion
12F8	Flagellar motor switch protein FliM	PP4358	Zelluläre Prozesse: Chemotaxis und Beweglichkeit

Die Tn5-Integration in Gene, deren Genprodukte in zelluläre Prozesse wie Adhäsion (PP0806, Klon 1G7), Chemotaxis, Beweglichkeit (PP4368, Klon 23B6; PP4358, Klon 12F8) und Detoxifizierung (PP1084, Klon 28F5) involviert sind sowie zu den Transport- und Bindeproteine (PP0043, Klon 34F5; PP0674, Klon 32C8) gehören, hatten eine Herabsetzung der Biofilmbildung an einer Polystyroloberfläche in den jeweiligen Mutanten zur Folge. Der gleiche Phänotyp wurde durch Tn5-Integration in eine RNA-Helikase (PP1868, Klon 28D3), einer Rubredoxinreduktase (PP5314, Klon 28E5) und ein Regulatorgen für den Phosphattransport (PP5325, Klon 7F9) erhalten.

Die durch die Tn5-Integration erhaltene Mutation in einem Gen, das für das Biosyntheseprotein B des Coenzym PQQ (PP0379) kodiert, ermöglichte der Mutante 14G4 besser an die Oberfläche der Mikrotiterplatten anzuheften und einen Biofilm zu bilden als der Wildtypstamm.

3.1.9 Untersuchung der Siderophordefekt- und Biofilmdefektmutanten auf deren Fähigkeit zur Geißelbewegung

Ziel dieses Experimentes war es, die Auswirkung der Transposonintegration in den bisher gefundenen genotypisch charakterisierten Mutanten (s. Tab 3.4 und 3.5) weiteren phänotypischen Abweichungen gegenüber dem Wildtyp zu zuordnen. Zur Herabsetzung der Biofilmbildung führten u. a. Transposonintegrationen, in Gene des Geißelmotors von *P. putida* KT2440 (s. Tab. 3.5). Der Geißelmotor ist für den Antrieb der Geißel wichtig, während die Fähigkeit zur geißelgesteuerten Bewegung oftmals die Voraussetzung für die initiale Anheftung an abiotische und biotische Oberflächen darstellt (O'Toole und Kolter, 1998 b; Pratt und Kolter, 1998; Kihara *et al.*, 2000).

Um die Auswirkungen der Tn5-Integrationen auf die bakterielle Beweglichkeit der Mutanten zu überprüfen, wurden diese und der Wildtyp punktartig (4 Parallelansätze) auf 0,3 %-igem Agar beimpft und inkubiert (s. Abb. 3.8). Die geißelgesteuerte Bewegung der Wildtyps war anhand der trüben Zone um den Inokulierungspunkt erkennbar.

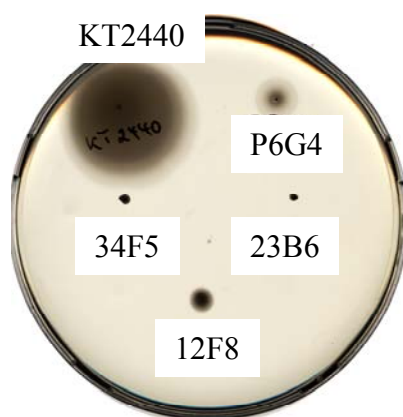


Abb. 3.8 Beweglichkeitstest auf Swim-Agar

Die geißelgesteuerte Beweglichkeit des Wildtyps sowie der Mutanten wurde in EM-Medium mit 0,3 % Agar nach Wachstum von ca. 20 Stunden bei RT überprüft.

Die Biofilmdefektmutante 12F8 und die Siderophordefektmutante P6G4 zeigten eine trübe Zone um den Inokulierungspunkt, die aber gegenüber dem Wildtyp einen geringeren Durchmesser aufwies. Bei den Biofilmdefektmutanten 23B6 und 34F5 war hingegen keine trübe Zone um den Inokulierungspunkt erkennbar (s. Abb. 3.8). So führte die jeweilige Tn5-Integration in den Stämmen 12F8 und P6G4 zur herabgesetzten Beweglichkeit und in den Mutanten 23B6 und 34F5 zu einer Unbeweglichkeit (s. Tab. 3.4 und 3.5).

3.1.9.1 Untersuchung der Flagellinexpression (FliC) in den unbeweglichen Mutanten

Mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese sollte festgestellt werden, ob das Geißelfilament FliC, der Hauptbestandteil der Geißen, infolge der Transposonintegration in den unbeweglichen Mutanten nicht gebildet wurde. Hierzu wurden von über Nacht in Minimal-Glucose-Medium gewachsenen Kulturen der Mutanten (12F8, 23B6, 34F5) sowie vom Wildtyp die Proteine extrahiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die FliC-Expression mit der des Wildtyps verglichen.

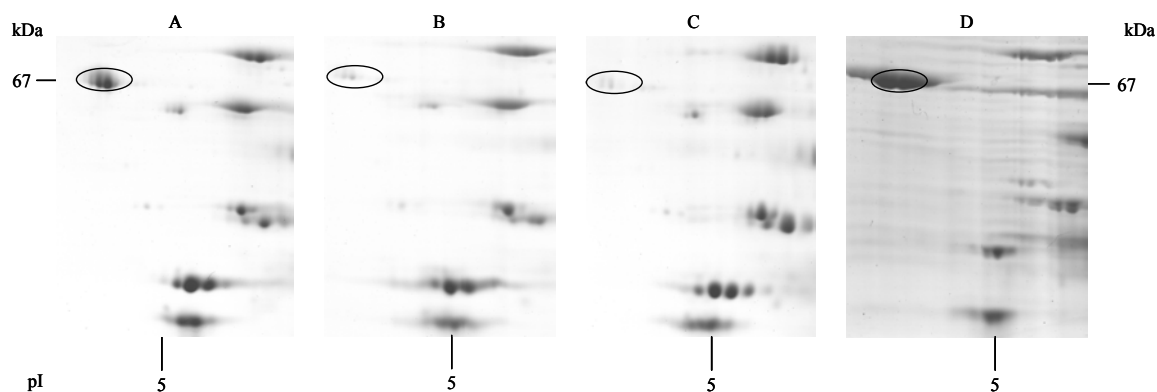


Abb. 3.9 Proteomausschnitte aus coomassiegefärbten 2D-Gelen von A: *P. putida* KT2440, B: Mutante 12F8, C: Mutante 23B6, D: Mutante: 34F5

Die mit dem schwarzen Kreis markierten Proteine stellen das Geißelfilament FliC dar (67,4 kDa, pI: 4,39). In der 1. Dimension wurde jeweils 300 µg Proteinextrakt in einer BioRad IEF Elektrophoreseeinheit für 160 kVh isoelektrophoretisch fokussiert. Die 2. Dimension wurde in einem 10–15 %-igem Polyacrylamidgel in einer vertikalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Proteinspots wurden massenspektrometrisch per MALDI-TOF analysiert.

Die *fliM*- bzw. die *fliG*-Mutante 12F8 und 23B6 exprimierten das Flagellin (FliC) im Vergleich zum Wildtyp sehr schwach (Abb. 3.9 A-C). Die Mutationen in den Flagellenmotorproteinen schienen einen direkten Einfluss auf die FliC-Bildung zu haben. Der Stamm 34F5, der die Mutation in einem Metallionen-RND-Efflux-Transporter trägt, exprimierte das Geißelfilament FliC ebenso stark wie der Wildtyp (Abb. 3.9 A und D).

3.1.9.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Geißeln in den unbeweglichen Mutanten

Mittels Elektronenmikroskopie wurde untersucht, ob im Wildtyp und den unbeweglichen Mutanten Geißeln sichtbar waren (s. 2.17.1).

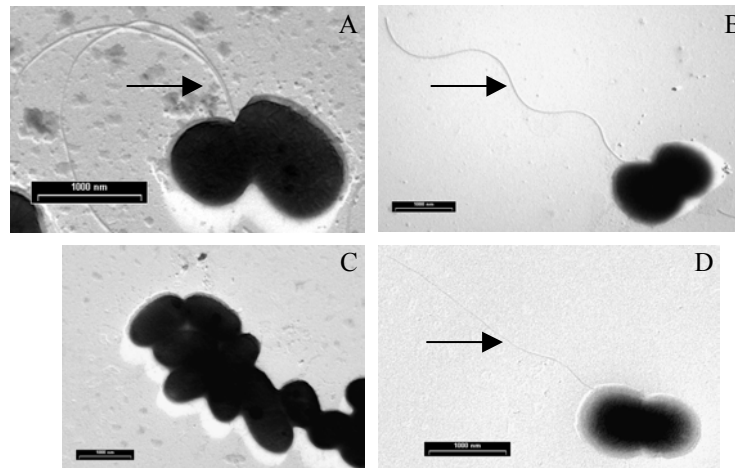


Abb. 3.10 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *P. putida* KT2440 (A) und den unbeweglichen Mutanten B: 12F8, C:23B6; D: 34F5.

Die Präparate wurden für die Elektronenmikroskopie fixiert und mit Platin/Kohlenstoff in einem Bedampfungswinkel von 15° schrägbedampft.

Der Vergleich der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass nur die *fliG*-Mutante 23B6 unbegeißelt war und auch keine abgeworfenen Geißeln im Präparat sichtbar waren. Die Mutation im Fagellenmotorschwichtprotein FliG schien somit einen Einfluss auf die Beweglichkeit des Bakteriums (s. Abb. 3.8), die Flagellinbildung FliC (s. Abb. 3.9) und auch auf die Geißelbildung zu haben (s. Abb. 3.10).

Bei allen anderen Mutanten sowie im Wildtypstamm waren Geißeln sichtbar (s. Abb. 3.10). Die Mutante 34F5 und die *fliM*-Mutante 12F8 zeigten weniger Geißeln als der Wildtypstamm. Das Geißelfilament FliC wurde jedoch in der Mutante 34F5 genauso stark exprimiert wie im Wildtypstamm. In der *fliM*-Mutante 12F8 wurde das Flagellin FliC genauso schwach wie in der unbegeißelten *fliG*-Mutante 23B6 gebildet (s. Abb. 3.9).

3.1.10 Fähigkeit ausgesuchter Biofilmddefektmutanten zur Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtypstamm

Um den Einfluss der Mutation auf die Besiedlung belebter Oberflächen festzustellen, wurde die unbewegliche *fliG*-Mutante 23B6 und die Mutante 1G7 (Mutation im Oberflächenadhäsionsprotein PP0806) jeweils zur Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtyp eingesetzt. Beide Mutanten zeigten im abiotischen System eine schlechtere Fähigkeit zur Biofilmbildung an die Oberfläche der Mikrotiterplatten als der Wildtyp.

Für dieses Experiment wurden in zwei unabhängigen Versuchen jeweils sechs steril aufgezogene Weizenkeimlinge mit einer Mischkultur aus dem Wildtyp und der jeweiligen Mutante im Verhältnis 1:1 für 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Ernte der adhäsierten Zellen von der Wurzeloberfläche. Durch Ausplattierung auf Vollmedium und nachfolgend auf Selektivmedium wurde das Verhältnis von kanamycinresistenten und kanamycinsensitiven Kolonien erhalten (s. 2.11.4, s. Abb. 3.11). Die Abbildung 3.11 stellt die relative Besiedlung der *fliG*-Mutante 23B6 bzw. der Mutante 1G7 mit dem Wildtyp an die Oberfläche der Weizenkeimlingswurzeln graphisch dar.

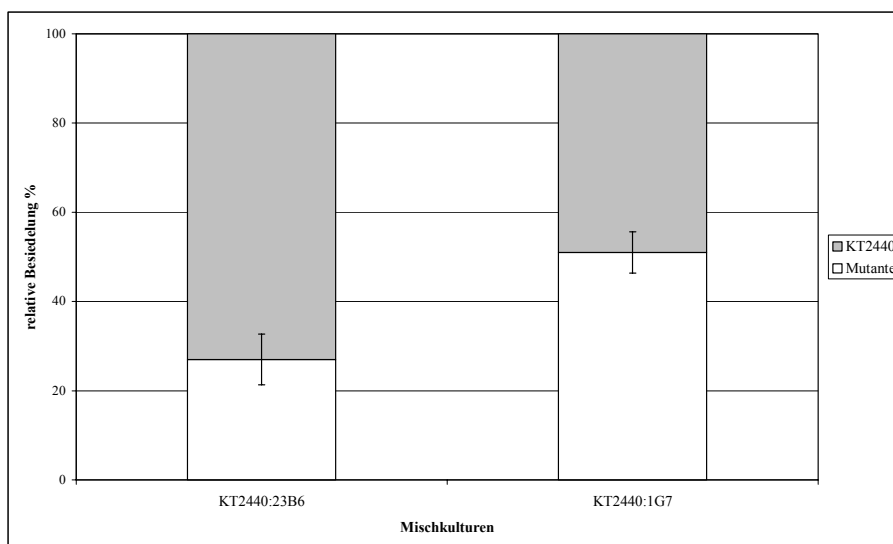


Abb. 3.11 Besiedlung der Weizenkeimlingswurzeln durch Mischkulturen aus dem Wildtyp und den Mutanten 23B6 bzw. 1G7

Die Inkubation der Mischkulturen erfolgte für 24 Stunden. Als Kontrollen dienten Mischkulturen ohne Weizenkeimlingswurzeln, die nach Ausplattierung das gleiche Verhältnis von Wildtyp zu Mutante zeigten.

Die Mutation im *fliG* führte in dem Stamm 23B6 zu einer signifikant herabgesetzten

Besiedlung von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtypstamm.

Die Tn5-Integration in ein Gen, das für ein Oberflächenadhäsionsprotein ("surface adhesion protein" PP0806) kodiert, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Kolonisierung der Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtypstamm. Es wurden gleiche Verhältnisse an kanamycinresistenten zu sensitiven Kolonien ermittelt.

3.2 Proteomanalyse von *P. putida* KT2440 in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingen

Mit Hilfe der Proteomanalyse sollten Genprodukte, die für das Überleben von *P. putida* KT2440 in der Rhizosphäre relevant sind, identifiziert werden. Um den Einfluss von Weizenkeimlingswurzeln auf *P. putida* KT2440 unter definierten sterilen Bedingungen zu untersuchen, wurde ein Pflanzennährlösungssystem gewählt. Die Abbildung 3.12 stellt einen Überblick für den experimentellen Ansatz zur Untersuchung von *P. putida* KT2440 in der Weizenkeimlingsrhizosphäre dar.

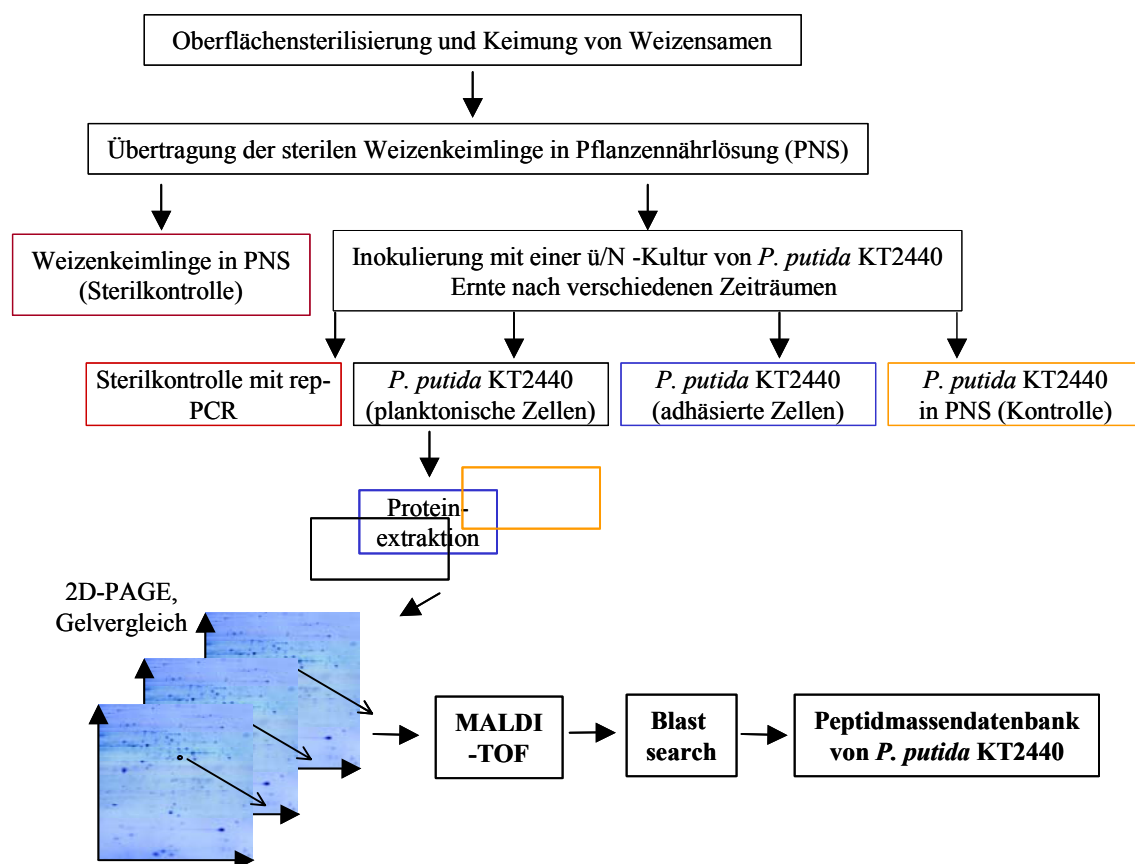


Abb. 3.12 Experimenteller Ansatz zur Identifizierung von Genprodukten, die für das Überleben von *P. putida* KT2440 in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingswurzeln relevant sind

Zunächst wurden die Weizensamen oberflächensterilisiert und nachfolgend zum Keimen auf Wasseragar ausgelegt. Die Weizenkeimlinge wurden danach in eine Pflanzennährlösung übertragen und dort ebenfalls für einen Zeitraum von 2 bis 5 Tagen inkubiert. Vor der Inkubation der Pflanzen mit einer Übernachtskultur von *P. putida* KT2440 wurde die Pflanzennährlösung gegen frische ausgetauscht. Der Versuch startete mit der Zugabe von *P. putida* KT2440-Zellen für verschieden lange Zeiträume (24 h bis 67 h). Als Sterilkontrolle dienten KT2440-Zellen in Pflanzennährlösung sowie die nicht beimpften Pflanzen. Vor jeder Proteinextraktion wurde von allen Proben eine Sterilitätskontrolle mittels repetitiver Fingerprintanalyse und einem Reinheitsausstrich auf Vollmedium angefertigt (s. 3.2.2). Die anschließende Proteomanalyse wurde nur mit kontaminationsfreien Ansätzen durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinextrakte (Pool aus acht Parallelansätzen) in einer 2 D-Gelelektrophorese getrennt. Nach Möglichkeit wurde für jede Proteinprobe eine Dreifachbestimmung durchgeführt und daraus ein Mastergel angefertigt, das analysiert wurde. Das war für die adhäsierten Zellen aufgrund der geringen Menge an Zellmaterial allerdings nicht möglich. Durch visuellen und computerunterstützten Vergleich der Gele wurden differentiell exprimierte Proteine ermittelt. Die Proteinspots wurden massenspektrometrisch analysiert und die erhaltenen Peptidmassen mit einer hauseigenen Peptidmassendatenbank verglichen, um so die Proteine zu identifizieren ("Peptide mass fingerprinting"). Die hauseigene Peptidmassendatenbank wurde durch Translation und nachfolgenden *in silico* Trypsinverdau der resultierenden Proteinsequenzen erhalten. Grundlage hierfür war die bis dahin zur Verfügung stehende Nukleinsäuresequenz von *P. putida* KT2440 (6-fold coverage Sequenz). Die eindeutige Proteinidentifizierung wurde z. T. durch die nicht immer ausreichend zur Identifizierung vorhandenen Peptidmassen erschwert, was u.a. in dem zu geringen Proteingehalt insbesondere von silbergefärbten Proteinspots begründet war. Ein weiterer Grund war die erschwerte Detektion von Proteinen mit hohem Lysinanteil, deren Peptide sich massenspektrometrisch schlecht auftrennen lassen. Dieses Problem konnte allerdings mit der Umwandlung von Lysin in Homoarginin (Guandinierung) teilweise umgangen werden (Hale *et al.*, 2000). Im Verlauf des Projektes "Sequenzierung und Funktionsanalyse des *P. putida* KT2440 Genoms" wurde eine 2 D-Referenzgelkarte von *P. putida* KT2440 erstellt (Heim *et al.*, 2003), die zur Proteinidentifizierung herangezogen wurde. Mit der Publikation des *P. putida* KT2440-Genoms wurden die Peptidmassendaten in der Proteindatenbank aktualisiert (Nelson *et al.*, 2002).

3.2.1 Auswahl eines hydroponischen Nährlösungssystem

Um den Einfluss der Weizenkeimlingswurzeln auf die Proteinbiosynthese von *P. putida* KT2440 zu untersuchen, wurde ein hydroponisches System, ein bodenfreies Testsystem, gewählt. Die Pflanzenwurzeln waren hier im ständigen Kontakt mit der Pflanzennährlösung, so dass eine ausreichende Wasser- und Nährstoffversorgung dieser garantiert war. Die einfache technische Handhabung des Lösungssystems war besonders für die Zellernte ein Vorteil gegenüber Systemen, in denen mit Boden oder Sand gearbeitet wird. Nachteile waren die erschwerte Sauerstoffversorgung sowohl für die Pflanze als auch für das Bakterium, da zum einen durch das Ausmaß des Reagenzglases das Raumvolumen begrenzt war und zum anderen der Versuch ohne Schütteln durchgeführt wurde.

3.2.2 Überprüfung der Reinheit von *P. putida* KT2440 im Kolonisierungsassay mittels genomischer Fingerprintanalyse

Da *P. putida* KT2440 im Vergleich zu seinem rifampicin-resistenten Abkömmling *P. putida* KT2442 (Bagdasarian *et al.*, 1981) keine natürliche Antibiotikaresistenz besitzt, konnte keine Zugabe eines Antibiotikums erfolgen, um das Wachstum möglicher Kontaminanten zu unterdrücken, die nicht durch die Oberflächensterilisierung der Weizensamen abgetötet worden waren. Deshalb wurde nach jeder Ernte des Versuchsansatzes, jeweils ein Aliquot für die Reinheitsüberprüfung zurückgestellt, bevor die Proben für die Proben für die 2 D-Gelelektrophorese weiterbearbeitet wurden. Zur Erkennung von Kontaminationen im Kolonisierungsassay diente neben mikroskopischer und makroskopischer Untersuchungen die Erstellung eines genomischen Fingerprints aus dem jeweils geernteten Zellmaterial im Vergleich zum Wildtypstamm. Für die genomische Fingerprintanalyse wurde die repetitive Polymerasekettenreaktion (rep-PCR) mit Amplifizierung des boxA1-Elementes eingesetzt. Diese ermöglicht die schnelle und einfache Unterscheidung von Bakterien bis hin zur Stammebene (Rademaker *et al.*, 1998). Daher wurde zunächst ein genomischer Fingerprint (s. Abb. 3.13) unterschiedlicher *Pseudomonas putida*-Biovar A-Stämme, die nicht auf Tryptophan wachsen (Stanier *et al.*, 1966) und dem *Pseudomonas* sp. MT1-Stamm erstellt (Faude, 1995).

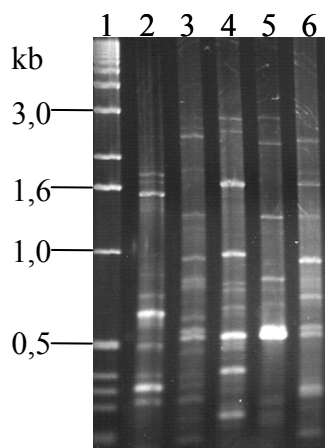


Abb. 3.13 Repetitive Fingerprintanalyse mittels BOX-PCR von unterschiedlichen *P. putida* Biovar A -Stämmen und dem *Pseudomonas* sp. MT1-Stamm

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im 1,5 %-igen TAE- Agarosegel (NuSieve 1:3 Agarose) bei 70 V für 4 Stunden mit 1 x TAE als Laufpuffer. Es wurden jeweils 5 µl des BOX-PCR-Produkts aufgetragen. Spur 1: 3 µl 1 kb DNA-Ladder (GIBCO), Spur 2: *P. sp.* MT1, Spur 3: *P. putida* DSM 291^T, Spur 4: *P. putida* KT2440 DSM 6125, Spur 5: *P. putida* DSM 50198, Spur 6: *P. putida* DSM 50208.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten boxA1-Elemente ergab für jeden Stamm einen spezifische Fingerabdruck. Für *P. putida* KT2440 charakteristische Banden wiesen eine Größe von 0,95 kb und 0,45 kb auf. Da Unterschiede im genomischen Fingerprint schnell und eindeutig erkannt werden konnten, wurde die BOX-PCR Methode zusätzlich zu den mikroskopischen und makroskopischen Reinheitsüberprüfungen zur Detektion möglicher Kontaminanten im Kolonisierungsexperiment eingesetzt (s. Abb.3.13).

Die Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch eine genomische Fingerprintanalyse nach Durchführung der BOX-PCR von *P. putida* KT2440-Zellen aus einem Kolonisierungsassay mit Weizenkeimlingen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten boxA1-Elemente nach einer Kolonie-PCR erfolgte für Kontrollzellen, die auf Vollmedium gewachsen waren, planktonischen und an Weizenkeimlingswurzeln adhäsierten *P. putida* KT2440-Zellen sowie Kontrollzellen, die nur in Pflanzennährflösung inkubiert worden waren. Der Vergleich der erhaltenen Fingerprints zeigt in den Spuren 2 und 4 -7, die für *P. putida* KT2440 typische Bande mit einer Größe von 0,95 kb (s. auch Abb. 3.13). In den Spuren 2 und 8 waren nicht alle für KT2440 typischen Banden erkennbar, was auf die Menge und die Qualität der genomischen DNA zurückzuführen war, die für die BOX-PCR eingesetzt wurde.

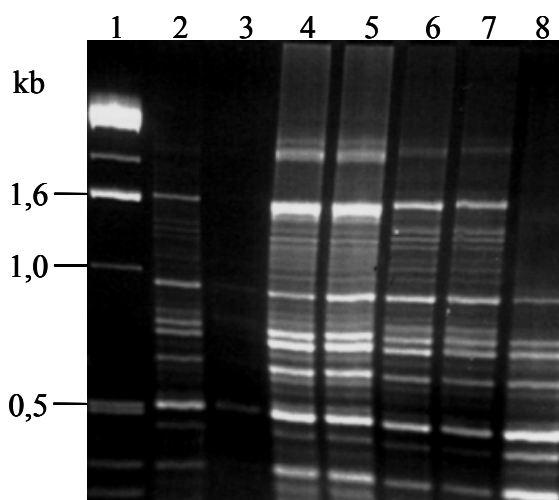


Abb. 3. 14 Repetitive Fingerprintanalyse mittels BOX-PCR von *P. putida* KT2440-Zellen aus einem Kolonisierungsassay mit Weizenkeimlingswurzeln

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im 3 %-igen Agarosegel bei 80 V für 5 Stunden mit 1x TAE als Laufpuffer. Es wurden jeweils 5 µl des BOX-PCR-Produkts aufgetragen. Spur 1: 5 µl 1 kb DNA-Ladder (GIBCO), Spur 2: *P. putida* KT2440 (Kontrolle: Reinausstrich auf EM-Medium), Spur 3 und 4: *P. putida* KT2440 in Pflanzennährlösung mit Weizenkeimlingswurzeln, Spur 5 und 6: *P. putida* KT2440-Zellen, die an Weizenkeimlingswurzeln adhäsieren waren, Spur 7 und 8: *P. putida* KT2440-Zellen in Pflanzennährlösung ohne Weizenkeimlingswurzeln.

3.2.3 Änderung des Proteommusters von *P. putida* KT2440 unter dem Einfluss von Weizenkeimlingswurzeln

In diesem Experiment wurden je zwei Weizenkeimlinge (ca. 5 Tage alt) über Nacht bei Raumtemperatur in Pflanzennährlösung inkubiert und mit 10^8 Zellen/ml einer über Nacht in Minimalmedium mit Glucose gewachsenen Kultur von *P. putida* KT2440 beimpft. Als Kontrolle wurden Zellen nur in Pflanzennährlösung gehalten. Nach einer Inkubationszeit von 67 h bei Raumtemperatur erfolgte die Zellernte. Jeder Ansatz wurde in sechs Parallelen durchgeführt, die jeweils zur Proteinextraktion vereinigt wurden, um eine ausreichende Proteinmenge für die 2 D-Gelelektrophorese zu erhalten (s. Abb. 3.15).

Für die 2 D-Gelelektrophorese wurden für die an den Pflanzenwurzeln adhäsierenden Zellen und Kontrollzellen jeweils zwei 2 D-Gele angefertigt, für die planktonischen Zellen, die unter dem Einfluss der Weizenwurzeln standen, vier 2 D-Gele. Aus diesen Gelen wurden die entsprechenden Mastergele angefertigt. Bevor die Zellen aufgeschlossen wurden, erfolgte die Sterilitätsüberprüfung per Reinheitsausstrich und repetitiver Fingerprintanalyse mit Hilfe der BOX-PCR.

Um die Proteine quantifizieren zu können, wurden die SDS-Gele zunächst mit dem

Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium bathophenanthroline disulfonate (RuBPS) (Rabilloud *et al.*, 2001) und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Durch die vorangegangene Inkubation mit RuBPS wurde die Blaufärbung sensitiviert.

Der Vergleich der Proteinmuster aus den Mastergelen von *P. putida* KT2440-Zellen in der Rhizosphäre sowie den Kontrollzellen erfolgte visuell und mit computerunterstützter Software (Compugen Z3). In Abbildung 3.15 ist ein 2 D-Gel eines Gesamtzellextraktes aus planktonischen *P. putida* KT2440-Zellen in der Weizenkeimlingsrhizosphäre dargestellt.

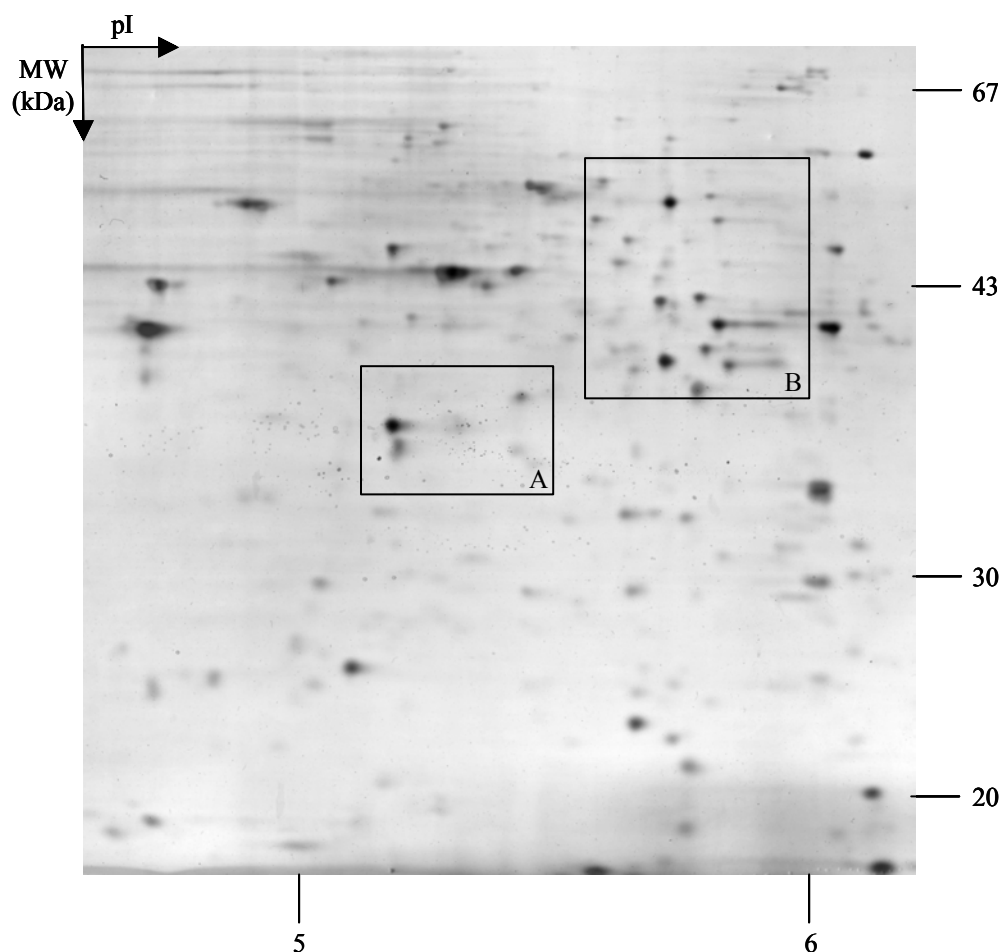


Abb. 3.15 Proteinmuster von planktonischen KT2440-Zellen, die unter dem Einfluss von Weizenkeimlingswurzeln gewachsen sind

70 µg Gesamtprotein wurde für die 1. Dimension mit linearen BioRAD-Immoboline Dry Strips (pH4-7) in einer BioRad IEF Elektrophoreseeinheit für 157 kVh isoelektrophoretisch fokussiert. Die 2. Dimension wurde in einem 10–15 %-igem Polyacrylamidgel in einer vertikalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Proteine wurden massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF analysiert. Die Bereiche A und B wurden in Abb. 3.16 vergrößert dargestellt.

Ein detaillierter Vergleich der Proteinmuster von planktonischen und adhäsierten Zellen sowie Kontrollzellen (s. Abb. 3.16) wurde durch Gegenüberstellung von Ausschnittsvergrößerungen des 2 D-Bildes aus der Abbildung 3.15 erhalten. Die interessanten Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert und durch Vergleich der erhaltenen Peptidfingerprints in einer hauseigenen Peptidmassendatenbank von *P. putida* KT2440 z. T. identifiziert werden.

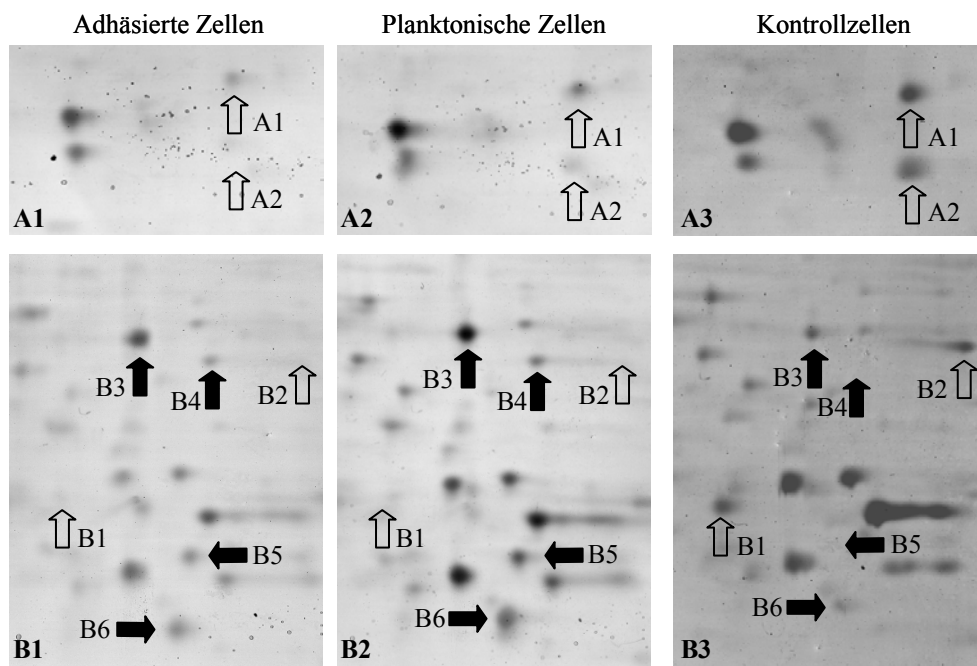


Abb. 3.16 Vergleiche vergrößerter Ausschnitte aus den 2 D-Gelen von planktonischen und adhäsierten Zellen unter dem Einfluss von Weizenwurzeln sowie Kontrollzellen

Die Bereiche A2 und B2 zeigen einen Ausschnitt des 2 D-Gels aus Abb. 3.15. Die Bereiche A1/A3 und B1/B3 geben die korrespondierenden Bereiche aus den 2 D-Gelen der Gesamtzellextrakte der adhäsierten und Kontrollzellen wieder. Geschlossene Pfeile zeigen Proteine, die in den Rhizosphärenzellen hochreguliert sind, offene Pfeile zeigen Proteine, die in den Kontrollzellen hochreguliert sind.

In der Tabelle 3.6 wurden nur die identifizierten, differentiell exprimierten Proteine mit ihrer Funktion in der Zelle sowie der Genomlokalisierung ihrer korrespondierenden Gene aufgeführt.

Tab. 3.6 Identifizierung ausgesuchter Proteine, die während des Kolonisierungsexperimentes differentiell exprimiert wurden

Spot	Proteinname	MW (kDa) [#]	pI [#]	Genom-lokus	Expres-sion*	Funktion / Zelluläre Aufgabe
A1	General amino acid ABC transporter, periplasmic binding protein (<i>aapJ</i>)	36,6	5,86	PP1297	K	Transport- und Bindeproteine: Aminosäuren, Peptide und Amine
B1	ABC sugar transporter, periplasmic sugar binding protein	45,0	6,17	PP1015	K	Transport- und Bindeprotein: Carbohydrate, organische Alkohole, Amine
B2	D-hydantoinase, authentic FRAMESHIFT	52,5	6,0	PP4036	K	Energiestoffwechsel.: Aminosäuren und Amine
B3	Arginine deiminase (<i>arcA</i>)	46,5	5,6	PP1001	R	Energiestoffwechsel: Aminosäuren und Amine
B5	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	43,9	6,4	PP3839	R	Energiestoffwechsel: Fermentation
B6	Conserved hypothetical protein	34,9	5,7	PP3783	R	Hypothetische Proteine: konserviert

[#] theoretische Werte

* höhere Expression: K = Kontrolle; R = planktonische und adhäsierende Zellen

Die über massenspektrometrische Analyse und Datenbankvergleiche identifizierten Proteine gehörten verschiedenen Funktionsgruppen an. Die größte Gruppe bildeten Proteine, die am Energiestoffwechsel beteiligt waren. Die mit B3, B4, B5 sowie B6 bezeichneten Proteinspots wurden in den adhäsierenden Zellen und in den Zellen, die unter dem Einfluss der Weizenwurzeln standen, stärker exprimiert als in den Kontrollzellen, die nicht mit Weizenwurzeln in Berührung kamen. Hierbei handelte es sich um zwei Proteine des Energiestoffwechsels, der Arginindeiminase ArcA (B3) und der Alkoholdehydrogenase (B5), sowie um ein als hypothetisch annotiertes Protein (B6), das 45 % Identität mit dem Syringomycin-Biosyntheseprotein aus *P. syringae* aufwies.

Höher exprimiert wurden die Proteine A1, A2, B1 und B2 in den Kontrollzellen, die nicht unter dem Einfluss von Weizenkeimlingswurzeln standen. Die Proteine A1 und B1 wurden als ABC-Transporterproteine für Aminosäuren bzw. für Carbohydrate identifiziert und gehörten zur Gruppe der Transport- und Bindeproteine. Beim Proteinspot B2 handelte es sich um eine D-Hydantoinase, eine Hydrolase, die am Energie- und am Pyrimidinstoffwechsel beteiligt ist. Die Proteine A2 und B4 konnten bisher noch nicht identifiziert werden.

Der oben beschriebene Versuch wurde erneut wiederholt. Hierzu wurden die Kontrollen zusätzlich mit 3 mM Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle inkubiert sowie ein Ansatz mit *P. putida* KT2440 und Weizenkeimlingen mit Glucose in Pflanzennährflösung. Es sollte nochmals verifiziert werden, inwieweit eine zusätzliche

Kohlenstoff- und Energiequelle einen Einfluss auf die Proteomveränderungen nahm. In der Abbildung 3.17 entspricht der vergrößerte Bereich dem Ausschnitt B aus Abbildung 3.15. Die identifizierten Proteinspots wurden entsprechend der Abbildung 3.16 benannt. Der ABC-Zucker-Transporter (B1) wurde sowohl mit als auch ohne Glucose als zusätzlicher Kohlenstoffquelle in den Kontrollzellen höher als in den planktonischen Zellen exprimiert. Die unter dem Einfluss der Weizenkeimlingswurzeln stehenden planktonischen Zellen exprimierten auch mit Glucose, die Alkoholdehydrogenase (B5) stärker als die Kontrollzellen. Ein Unterschied zeigte sich bezüglich des als hypothetisch annotierten Proteins B6. Dieses Protein wurde in allen planktonischen Zellen, aber auch in den Kontrollzellen mit Glucose höher exprimiert als in den Kontrollzellen, die ohne externe Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren.

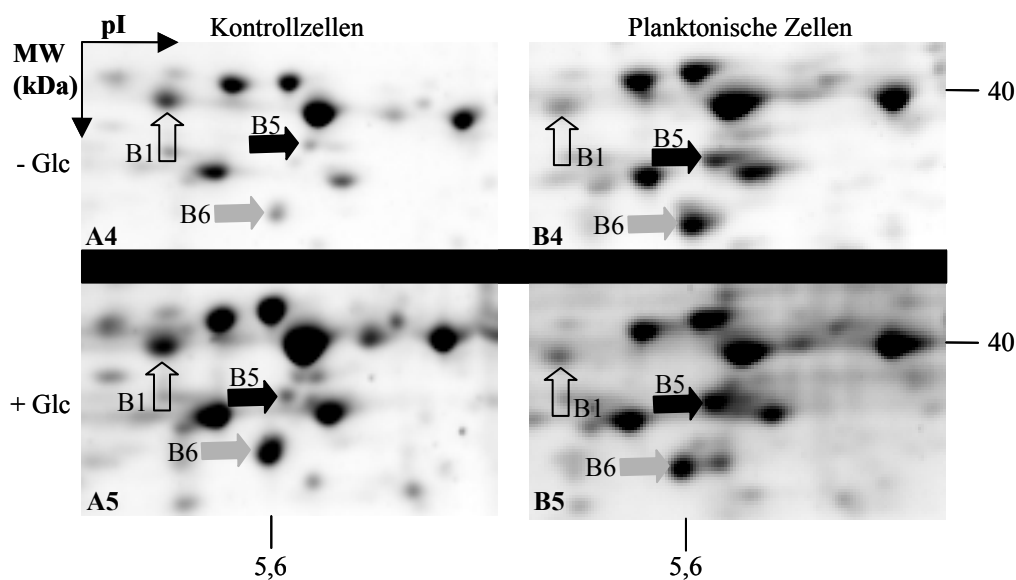


Abb. 3.17 Proteomausschnitte von planktonischen Zellen unter dem Einfluss von Weizenwurzeln sowie Kontrollzellen mit und ohne Glucose als zusätzlicher Kohlenstoff- und Energiequelle

Die Bereiche A4 und B4 zeigen einen detaillierten Ausschnitt des 2 D-Gels aus Abb. 3.15. Die Bereiche A5 und B5 geben die korrespondierenden Bereiche aus den 2 D-Gelen der Gesamtzellextrakte Kontrollzellen und planktonischen Zellen mit Glucose wieder. Geschlossene Pfeile zeigen Proteine, die in den planktonischen Zellen hochreguliert sind, offene Pfeile zeigen Proteine, die in den Kontrollzellen hochreguliert sind. Der graue Pfeil stellt ein Protein dar, das in den mit Glucose gewachsenen Zellen sowie den planktonischen Zellen, die ohne Glucose inkubiert wurden sind, hochreguliert ist.

3.2.4 Proteinexpression beim Wachstum von *P. putida* KT2440 in unterschiedlichen Nährmedien

Mit diesem Experiment sollten die Proteinexpressionsmuster von *P. putida* KT2440-Zellen, die in gesammelten Wurzelexudaten von Weizenkeimlingen kultiviert wurden mit den auf einem Komplexmedium gewachsenen Zellen verglichen werden. Die Weizenwurzeln scheiden bis zu 31 % ihrer Assimilate in das flüssige Mineralmedium aus. Dabei handelt es sich im wesentlichen um Aminosäuren, organische Säuren und Zucker (Whipps, 1990). Die Weizenkeimlingswurzelexudate wurden durch 7-tägige Inkubation von Weizenkeimlingswurzeln in Pflanzennährlösung erhalten (s. 2.11.5). Bevor die Exudate für das Experiment eingesetzt wurden, wurde ein Ausstrich auf Vollmedium angefertigt, um auszuschließen, dass die Exudate nicht durch Kontaminanten bereits verändert waren. Anschließend wurden die Exudate sterilfiltriert. Die Inkubation fand unter aeroben Bedingungen (Schütteln) bei 30 °C ü/N statt. Die in Komplexmedium gewachsenen Zellen erreichten hier eine optische Dichte von 1,8, die mit Wurzelexudaten kultivierten eine optische Dichte von 0,8.

Die Abbildung 3.18 zeigt ein Proteommuster von *P. putida* KT2440 -Zellen, die mit Wurzelexudaten gewachsen waren.

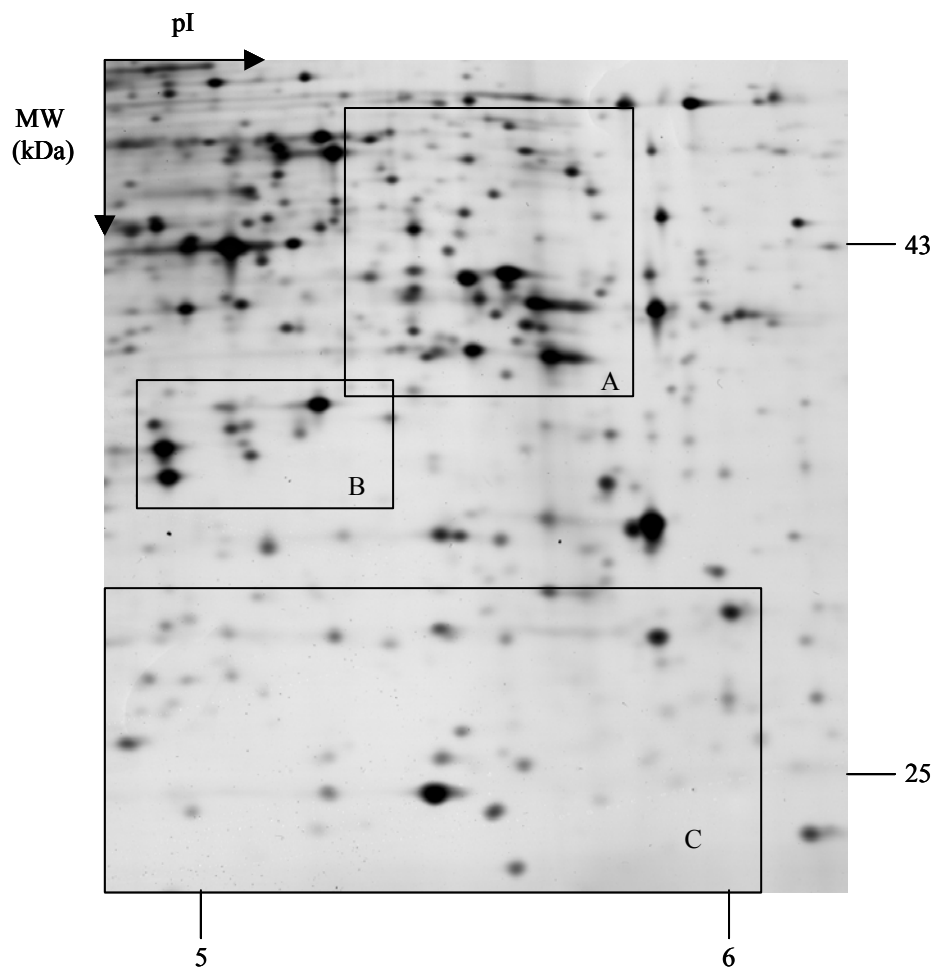


Abb. 3.18 Proteinmuster von in Wurzelexudaten gewachsenen Zellen

50 µg Gesamtprotein wurde für die 1. Dimension mit linearen BioRAD-Immoboline Dry Strips (pH4-7) in einer BioRad IEF Elektrophoreseeinheit für 153 kVh isoelektrophoretisch fokussiert. Die 2. Dimension wurde in einem 12–15 %-igem Polyacrylamidgel in einer vertikalen Elektrophoresekammer durchgeführt.

Ein Vergleich der 2 D-Gele von in Wurzelexudaten sowie in Vollmedium gewachsenen Zellen, ist in der Abbildung 3.19 durch Gegenüberstellung vergrößerter Gelausschnitte des 2 D-Bildes aus der Abbildung 3.18 dargestellt.

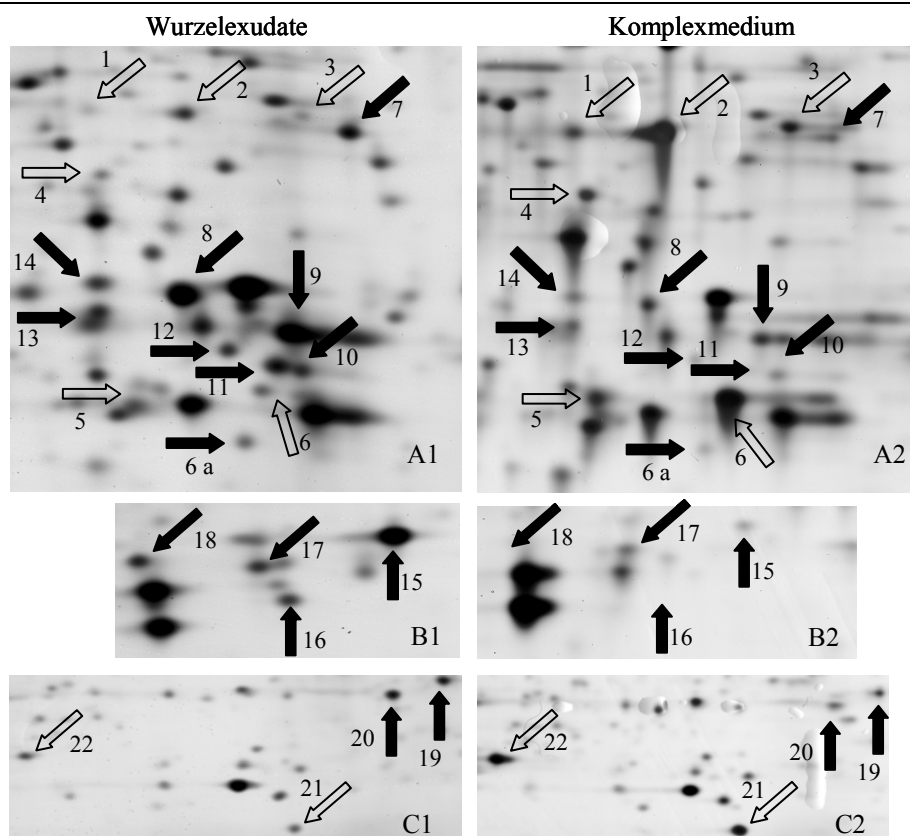


Abb. 3.19 Vergleiche von vergrößerten Proteomausschnitte aus den 2 D-Gelen von Zellen, die mit Wurzelexudaten und in Komplexmedium inkubiert wurden.

Die Bereiche A1 bis C1 zeigen einen vergrößerten Ausschnitt des 2 D-Gels aus Abb. 3.18. Die Bereiche A2 bis C2 geben die korrespondierenden Bereiche aus den 2 D-Gelen der Gesamtzellextrakte der in Komplexmedium inkubierten Zellen wieder. Offene Pfeile zeigen Proteine, die im Komplexmedium hochreguliert sind, geschlossene Pfeile zeigen Proteine, die in den mit Wurzelexudaten inkubierten Zellen hochreguliert sind.

In der Tabelle 3.7 sind die im Experiment differentiell exprimierte Proteine aufgeführt, die identifiziert werden konnten. Eine Identifikation aller Proteine war aus den bereits genannten Gründen (s. 3.2) nicht möglich.

Tab. 3.7 Identifizierung von Proteinen, die während des Wachstums in Komplexmedium und mit Weizenkeimlingswurzelexudaten differentiell exprimiert wurden

Spot	Proteinname	MW (kDa) [#]	pI [#]	Expres-sion*	Genom-lokus	Funktion/ Zelluläre Aufgabe
21	Conserved hypothetical protein	19,4	5,3	-	PP3098	Hypothetische Proteine: konserviert
22	Antioxidant, AhpC/Tsa family	21,7	4,8	-	PP1084	Zelluläre Prozesse: Detoxifizierung
6	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	43,9	6,4	-	PP3839	Energiestoffwechsel: Fermentation
2	Arginine deiminase (arcA)	46,5	5,6	-	PP1001	Energiestoffwechsel: Aminosäuren u. Amine
15	General amino acid ABC-transporter, periplasmic bind protein (<i>aapJ</i>)	36,6	5,8	+	PP1297	Transport- und Bindeproteine: Aminosäuren, Peptide und Amine

Spot	Proteinname	MW (kDa) [#]	pI [#]	Expres-sion*	Genom-lokus	Funktion/ Zelluläre Aufgabe
14	ABC sugar transporter, periplasmic sugar binding protein (braC)	45,1	6,2	+	PP1141	Transport- und Bindeproteine: Carbohydrate, organische Alkohole, Amine
8	Branched chain amino acid ABC transporter periplasmic amino acid binding protein	40,0	6,1	+	PP4867	Transport- und Bindeproteine: Carbohydrate, organische Alkohole, Amine
9 u. 13	ABC sugar transporter, periplasmic sugar binding protein	45,1	6,17	+	PP1015	Transport- und Bindeproteine: Carbohydrate, organische Alkohole, Amine
6a	Conserved hypothetical protein	34,9	5,7	+	PP3783	Hypothetische Proteine: konserviert

[#] theoretische Werte

* Expression: - niedriger in -Wurzelexudaten; + höher in Wurzelexudaten

Die mit Wurzelexudaten gewachsenen Zellen zeigten eine höhere Expression von Proteinen, die zu den Transport- und Bindeproteine gehörten. Hierbei waren Transport- und Bindeproteine für verschiedene Komponenten wie Aminosäuren und Amine sowie Carbohydrate und organische Alkohole betroffen. Weiterhin wurde das als hypothetisch annotierte Protein (PP3783) mit 45 % Identität zum Syringomycin-Biosyntheseprotein aus *P. syringae* ebenfalls höher exprimiert. Die in diesem Experiment höher exprimierten Proteine wurden auch in den vorangegangenen Kolonisierungsexperimenten sowohl in Kontrollzellen als auch in den planktonischen Zellen höher exprimiert (s. auch Abb. 3.17). Diese Transport- und Bindeproteine schien der Organismus generell in Minimalmedium höher zu exprimieren als im Komplexmedium.

Vier Proteine wurden identifiziert, die beim Wachstum mit Komplexmedium höher exprimiert wurden als beim Wachstum mit Wurzelexudaten. Hierbei handelte es sich um ein als hypothetisch annotiertes Protein, das 57 % Identität zu einem ebenfalls hypothetisch annotierten Protein (PA0085) aus *P. aeruginosa* PAO1 zeigte. Weiterhin wurde ein Detoxifizierungsprotein (PP1084) höher exprimiert sowie die Alkoholdehydrogenase (PP3839) und die Arginindeiminase (PP1001), die beide am Energiestoffwechsel beteiligt sind.

3.2.5 *De novo* synthetisierte Proteine von *P. putida* KT2440 in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingen

Zur Untersuchung des Einflusses von Weizenkeimlingswurzeln auf *P. putida* KT2440 wurde ein weiterer Ansatz gewählt, der zusätzliche Informationen über *de novo* synthetisierte Proteine von KT2440 liefern sollte. Hierzu wurden wie bereits beschrieben, sterile Weizenkeimlinge angezogen und mit 10^8 Zellen/ml einer Übernachtskultur von *P. putida* KT2440 für 24 Stunden beimpft. Vor der Zellernte wurden die Proben (KT2440 mit Pflanzen) sowie die Negativkontrolle (KT2400-Zellen in Pflanzennährflösung) mit ^{35}S -markierten Methionin für drei Stunden inkubiert. Die Markierung mittels ^{35}S -Methionin ist eine sensitive Methode zur Detektion von Proteinen, die einen hohen Turnover (Proteinsynthese und Degradation) zeigen. Das ^{35}S -Methionin wird wie das ungelabelte Methionin bei der Proteinbiosynthese in die Proteine eingebaut. Bei Proteinen, die mit einer hohen Umsatzrate synthetisiert und abgebaut werden, erfolgt der Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure schneller als bei Proteinen, mit langsamerem Turnover. Dadurch können Proteine mit hoher Umsatzrate in diesem Experiment mittels Labelling detektiert werden, obwohl sie im silbergefärbten Gel nicht sichtbar sind.

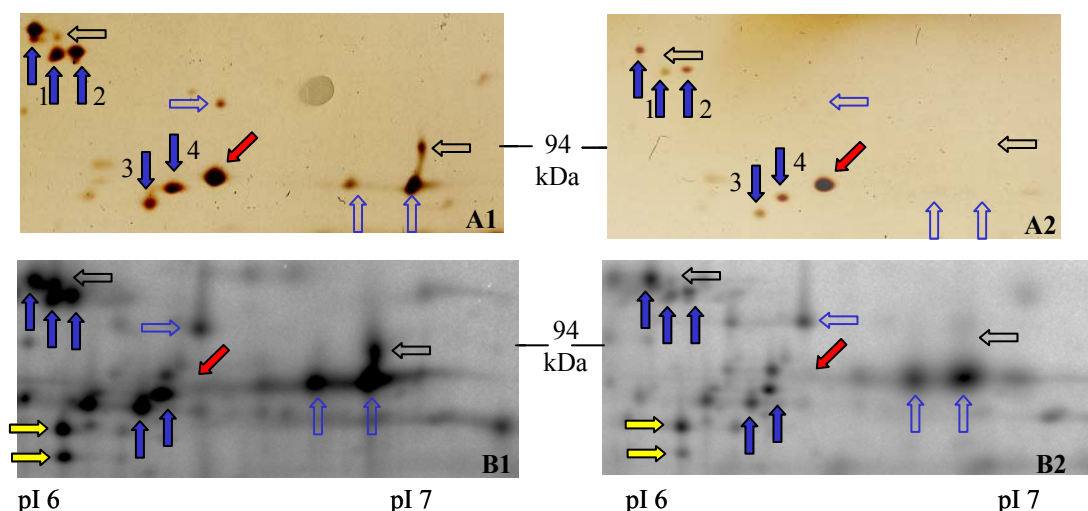


Abb. 3.20 Ausschnitt eines Proteinmusters von *P. putida* KT2440-Zellen in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingswurzeln (A1) und Kontrollzellen (A2)

A: Gesamtprotein im silbergefärbten SDS-Gel; B: Korrespondierende Phosphorimages der silbergefärbten SDS-Gele nach dreistündiger Markierung mit ^{35}S -Methionin vor der Zellernte; Expositionszeit: 2 Tage. Die blauen geschlossenen Pfeile markieren Proteine, die in beiden Proben sowohl im silbergefärbten SDS-Gel als auch im Phosphorimage sichtbar sind. Die gelb geschlossenen Pfeile zeigen nur Proteine, die in den Phosphorimages sichtbar sind; die roten Pfeile markieren nur in den Silbergelen sichtbare Proteine. Blaue offene Pfeile sind nur in den Rhizosphärenzellen sichtbar und im Phosphorimage des Kontrollgels; schwarze offene Pfeile markieren Proteine nur in den Rhizosphärenzellen.

In der Abbildung 3.20 markieren die gelben geschlossenen Pfeile diejenigen Proteine, die mit einem schnellen Turnover unter dem Einfluss von Pflanzenwurzeln in der Rhizosphäre und in den Kontrollzellen synthetisiert wurden, aber nicht in den korrespondierenden silbergefärbten Gele detektiert werden konnten.

Das mit einem roten Pfeil markierte Protein war nur in den Silbergelen erkennbar. Es wurde sowohl in Zellen, die unter dem Einfluss der Pflanzen standen, als auch in den Kontrollzellen gebildet. Dieses Protein wurde über den gesamten Zeitraum gebildet, aber mit einem langsamen Turnover, so dass es nicht in den Phosphoimages sichtbar war.

Weiterhin ließen sich in der Kontrolle drei Proteine (blaue offene Pfeile) im Phosphoimage detektieren, die im Silbergel nicht sichtbar waren. Die entsprechenden Proteine wurden in der Rhizosphäre auch über einen langen Zeitraum synthetisiert und waren daher auch im silbergefärbten SDS-Gel sichtbar. Die mit schwarzen offenen Pfeilen markierten Proteine konnten nur in den Rhizosphärenzellen sowohl im silbergefärbten Gel als auch in den korrespondierenden Phosphoimages detektiert werden. In den Kontrollzellen waren sie nicht sichtbar.

Aus den silbergefärbten SDS-Gelen wurden einige Proteine (mit Nummern versehen) identifiziert und in der Tabelle 3.8 aufgeführt. Eine Identifizierung der radioaktiv gelabelten Proteine, die im silbergefärbten SDS-Gel nicht sichtbar waren, war aufgrund des Detektionslimits (1 pmol Protein zur eindeutigen Proteinidentifizierung) mit der zur Verfügung stehenden Analytik nicht möglich.

Tab. 3.8 Identifizierte Proteinspots in den silbergefärbten SDS-Gelen

Spot	Proteinname	MW (kDa) [#]	pI [#]	Genom-lokus	Funktion/ Zelluläre Aufgabe
1	Katalase/Peroxidase HPI	82,0	5,64	PP3668	Zelluläre Prozesse: Detoxifizierung
2	Molobdopterin oxidoreductase, α-subunit	86,3	6,50	PP4596	Energiemetabolismus. anaerob
3	Dihydroxy-acid dehydratase (<i>ihvD</i>)	65,6	5,61	PP5128	Aminosäurestoffwechsel: Pyruvat-Familie
4	Conserved hypothetical protein	73,7	5,74	PP0397	Hypothetische Proteine: konserviert

[#] theoretische Werte

In der Abbildung 3.21 wurden nochmals Proteomausschnitte von Phosphoimages von *P. putida* KT2440-Zellen in der Rhizosphäre und der Kontrolle dargestellt. So wurden die mit grünen Pfeilen gekennzeichneten Proteine lediglich unter Wurzeinfluss

exprimiert. Das mit einem weißen Pfeil markierte Protein wurde synthetisiert, wenn *P. putida* nicht unter dem Einfluss der Weizenkeimlingswurzeln stand. In beiden Phosphoimages kam es zur Synthese des mit einem gelben Kreis gekennzeichneten Proteins, welches in den entsprechenden Silbergelen, als Serin-Hydroxymethyltransferase mit einem pI von ca. 6,5 und einem Molekulargewicht von 40 kDa identifiziert wurde.

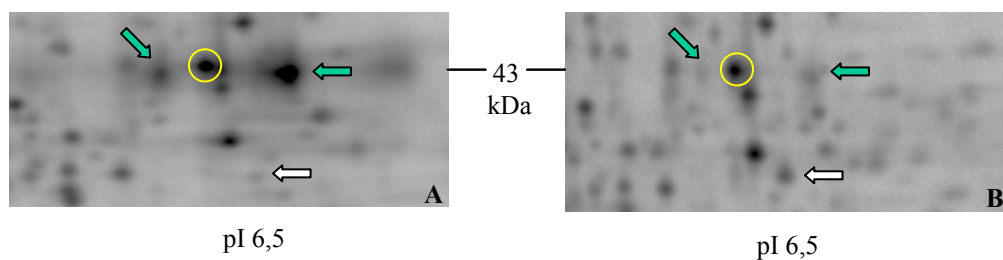


Abb. 3.21. Ausschnitt eines Proteinmusters von *P. putida* KT2440-Zellen unter dem Einfluss der Rhizosphäre (A) und Kontrolle (B)

A, B: Phosphoimages von silbergefärbten SDS-Gelen (hier nicht gezeigt) nach dreistündiger Inkubation mit ^{35}S -Methionin; Expositionszeit: 2 Tage. Grüne Pfeile stellen nur unter dem Einfluss der Weizenkeimlingswurzeln synthetisierte Proteine dar. Der weiße Pfeil kennzeichnet ein nur in den Kontrollzellen synthetisiertes Protein.

4 Diskussion

4.1 Transposonmutagenese als Werkzeug zur Genomanalyse in *P. putida* KT2440

Die abgeschlossene Sequenzierung, die *in silico* Genomanalyse und die vergleichende Genomanalyse mit anderen Rhizosphärenorganismen erlaubt die Einsicht in das genetische Potential von *P. putida* KT2440 und lässt Rückschlüsse auf seine Anpassungsfähigkeit an bestimmte Lebensräume wie der Rhizosphäre zu (s. Nelson *et al.*, 2002).

In welchem Umfang das vorhandene genetische Potential eines Organismus für die Besiedlung eines Lebensraums *in vivo* genutzt wird, kann derzeit nur im experimentellen System beantwortet werden. Die Rhizosphäre (Oberfläche von Pflanzenwurzeln und deren unmittelbare Umgebung) stellt einen Lebensraum dar, der oftmals als "black box" bezeichnet wird, da nur wenig über das Nährstoffangebot, in Form der von den Pflanzenwurzeln ausgeschiedenen Exudate (u. a. Zucker, Aminosäuren), der Verfügbarkeit von Sauerstoff, Eisen und Phosphat sowie der Interaktion mit anderen Organismen und den Pflanzen bekannt ist (de Weger *et al.*, 1995). Zur Untersuchung eines Habitats wie der Rhizosphäre gilt die Natur als bestes Testsystem. Natürliche Systeme haben allerdings den Nachteil, dass sie extremen Schwankungen durch den Einfluss biotischer und abiotischer Faktoren unterliegen und die Reproduzierbarkeit begrenzt ist. Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die Rhizosphärenmikroorganismen zur Pflanzenbesiedlung einsetzen, sind mehrere Ansätze bekannt.

- Allgemeiner Ansatz: Screening von Mutanten auf die Fähigkeit zur Kolonisierung der Rhizosphäre (Dekkers *et al.*, 1998 a, b, c; Espinosa-Urgel *et al.*, 2001).
- Direkter Ansatz: Untersuchung und Verifizierung von postulierten Faktoren (z. B. Adhäsion, Bewegung), die für die Rolle der Mikroben-Pflanzen-Interaktion wichtig sein könnten (de Weger *et al.*, 1987; Buell *et al.*, 1992; Dörr *et al.*, 1998; Espinosa-Urgel *et al.*, 2000).

- "In vivo expression technology" (IVET), mit der Gene identifiziert werden können, die habitatspezifisch induziert werden (Rainey, 1999; Rainey und Preston, 2000).

Das methodische Vorgehen in dieser Arbeit umfasste einen genetischen und einen proteomanalytischen Ansatz. Die Arbeit wurde im Rahmen des Projektes "Sequenzierung und Funktionsanalyse des *P. putida* KT2440-Genoms" durchgeführt. Zur Untersuchung eines breiten Spektrums physiologischer und metabolischer Eigenschaften des Mikroorganismus wurde zunächst eine willkürliche Transposonmutagenese des Stammes durchgeführt (s. 3.1.2). Mit dem Anlegen einer genotypisch charakterisierten Mutantenbibliothek, die in Zukunft für die Funktionsanalyse des Organismus hilfreich sein soll, wurde begonnen (s. 3.1.5; s. Tab. 7.2).

Da für die Kolonisierung der Rhizosphäre sehr unterschiedliche Faktoren (s. Abb. 4.1) wichtig sein können wie z. B. Geißeln (de Weger *et al.*, 1987), Pili (Vesper *et al.*, 1987), Proteine der äußeren Membran (de Mot *et al.*, 1992), Oberflächenadhäsionsproteine (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000), die Synthese von O-Antigen-Lipopolysacchariden (de Weger *et al.*, 1989), aber auch die Fähigkeit zur Aminosäurebiosynthese (Simons *et al.*, 1997) und zur Verwertung von Wurzelexudaten (Lugtenberg *et al.*, 1999) wurden zunächst Untersuchungen zur Adhäsionsfähigkeit des Bakteriums an Oberflächen durchgeführt. Darüber hinaus wurden Gene identifiziert, die bei der Siderophorbildung wichtig sind. Die genotypische Analyse auffälliger Mutanten führte in der Folge zur differenzierteren Charakterisierung weiterer phänotypischer Eigenschaften des Organismus (z. B.: Beweglichkeit, Geißelbildung, oxidative Stressantwort) insbesondere hinsichtlich ihrer Relevanz bei der Rhizosphärenkolonisierung. Diese Vorgehensweise entsprach dem direkten Ansatz, nämlich der Untersuchung und Verifizierung postulierter Faktoren, die bei der Interaktion von Mikroben und Pflanzen als relevant vermutet werden. Dieser Versuchsansatz ist sicherlich limitierend, da er nicht alle Faktoren erfasst werden, die für eine effiziente Kolonisierung der Rhizosphäre relevant sein können. Andererseits wurde hiermit der Fokus auf bestimmte Faktoren gelegt, die gerade mit der Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit, die den initialen Schritt zu einer effizienten Besiedlung eines Habitats darstellt, berücksichtigte. Die durchgeführte Proteomanalyse ermöglichte die Identifizierung von Genprodukten, die der Stamm in der Rhizosphäre u. a. zur Verwertung von Wurzelexudaten synthetisiert. Dieser proteomanalytische Ansatz (s. 3.2, s. 4.2) stellte eine wichtige Ergänzung zum genetischen Ansatz (genotypische und phänotypische Analyse der Transposonmutanten) dar.

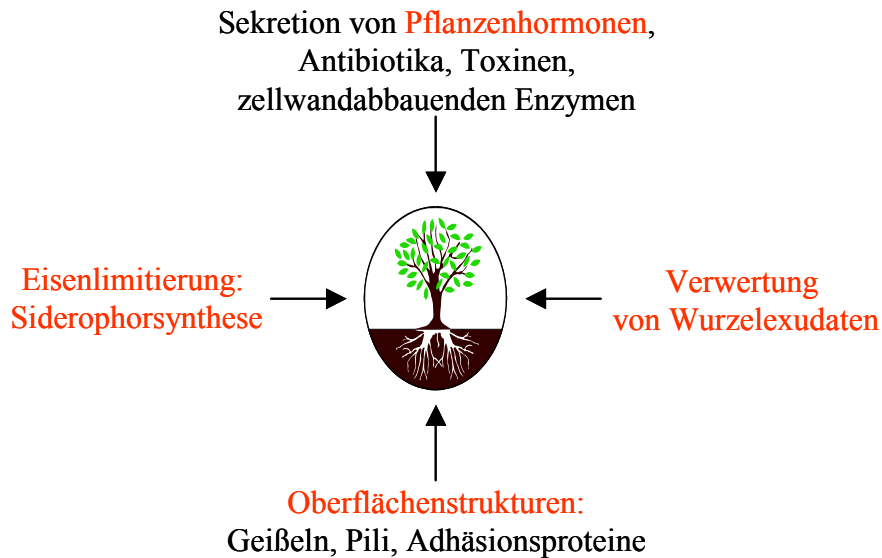


Abb. 4.1 Wichtige Faktoren für eine effiziente Rhizosphärenbesiedlung durch Pseudomonaden

Die mit rot unterlegten Faktoren wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Produktion des Pflanzenhormons Auxin wurde in KT2440 nachgewiesen (Dr. J. Lottmann, pers. Mitteilung).

4.1.1 Auswirkung von Mutationen auf die Adhäsionsfähigkeit von *P. putida* KT2440 an Oberflächen

Abiotische Oberfläche

In dieser Arbeit wurde zunächst ein abiotisches System gewählt, um Gene zu identifizieren, die für die Adhäsion an Oberflächen wichtig sind (s. 3.1.8). Auf diese Weise konnten die Mutanten identifiziert und nachfolgend in einem natürlichen System eingesetzt werden, um zu verifizieren, inwieweit es sich um generell wichtige Adhäsionsfaktoren oder für abiotische bzw. biotische Systeme spezifische Faktoren handelte (s. 3.1.10). Die Adhäsion und nachfolgende Biofilmbildung an Oberflächen ist aber nicht nur von der Art und Beschaffenheit der Oberfläche, sondern auch vom Nährstoffangebot sowie von den Mikroorganismen abhängig (O'Toole und Kolter, 1998 a; O'Toole *et al.*, 2000). So erfolgte die Adhäsion und nachfolgende Biofilmbildung von *P. putida* KT2440 an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen in einem kürzeren Zeitraum als in Komplexmedium (s. 3.1.8).

Beim Screening der Mutanten war auffällig, dass keine Mutanten selektiert wurden, die die Fähigkeit zur Biofilmbildung gänzlich verloren hatten, d. h. keinen detektierbaren Biofilm bildeten. Zum einen könnte es sein, dass KT2440 unter den gewählten Screeningbedingungen (Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoff- und Energie-

quelle sowie Polystyroloberfläche) einen solchen Phänotyp nicht zeigt. Auf der anderen Seite repräsentieren die bisher untersuchten 3500 Mutanten nicht das gesamte genetische Potential eines Bakteriums mit einer Genomgröße von 6,2 Mb, so dass möglicherweise bisher noch keine Totaldefektmutanten identifiziert werden konnten. Um zu gewährleisten, dass in einem Bakterium wie *P. putida* KT2440 mit einer Anzahl von 5420 ORFs, die eine durchschnittliche Größe von 0,998 kb aufweisen (Nelson *et al.*, 2002) eine Transposonintegration in jedem ORF mindestens einmal auftreten sollte, wäre eine Mutantenbibliothek von 11000 Mutanten optimal gewesen. Hierzu lässt sich anmerken, dass mit einer im Aufbau befindlichen Mutantenbibliothek gearbeitet wurde.

Die zehn im Screening gefundenen Klone, die eine Veränderung in der Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, zeigten Insertionen in Gene, deren Proteine zu den Transport- und Bindeproteinen gehören oder auch in zelluläre Prozesse wie der Adhäsion, Chemotaxis und Beweglichkeit involviert sind (s. 3.1.8; Tab. 3.5). Diese Diversität unterstreicht das komplexe Netzwerk der Faktoren, die an der Adhäsion und nachfolgenden Biofilmbildung unter definierten Bedingungen eines Bakteriums beteiligt sein können.

Oberflächenproteine/Transportproteine

Die Funktion von Oberflächenproteinen sowie Transport- und Bindeproteinen als Adhäsine wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten in verschiedenen Mikroorganismen beschrieben (Matthysse *et al.*, 1996; Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden drei Mutanten mit Tn5-Integration in Genen identifiziert, die für ein Oberflächenprotein bzw. Transport- und Bindeproteine kodieren, was zu einer Herabsetzung in der Biofilmbildung in der jeweiligen Mutante führte.

Hierbei handelte es sich um ein Gen, das eines der drei größten Proteine (19 kb) in *P. putida* KT2440, ein Oberflächenadhäsionsprotein (PP0806) kodiert. Dieses Protein, zeigt 44 % Ähnlichkeit zu einem Oberflächenprotein aus *Staphylococcus aureus*, das ebenfalls an der Biofilmbildung in diesem Organismus beteiligt ist (Cucarella *et al.*, 2001). Von Espinosa-Urgel und Mitarbeitern wurde PP0806 als essentiell für die Adhäsion an Maissamen charakterisiert (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Eine weitere Mutante wies eine Tn5-Integration in einem Metallionenefflux-RND ("resistance/nodulation/cell division")-Transporter (PP0043) auf, die andere Mutante war in einem ABC-Transportprotein mutiert (PP0674). Effluxpumpen sind für die Detoxifizierung in Mikroorganismen wichtig (Segura *et al.*, 1999). Erst kürzlich wurde in *Magnaporthe grisea*, einem pflanzenpathogenen Pilz eine Effluxpumpe als

Pathogenitätsfaktor identifiziert (Urban *et al.*, 1999). Die Funktion solcher Transporter/Pumpen könnte einen Schutz des Bakteriums vor toxischen Produkten darstellen, die von der Pflanze oder anderen Organismen produziert werden. Palumbo und Mitarbeiter charakterisierten ebenfalls eine zur RND-Superfamilie gehörende Isoflavonoid-induzierbare Effluxpumpe in *Agrobacterium tumefaciens* 1D1609 als wichtigen Faktor für die kompetitive Kolonisierung von Wurzeln (Palumbo *et al.*, 1998), was die Annahme unterstreicht, dass gemeinsame Mechanismen in pathogenen und nicht-pathogenen Organismen für die Kolonisierung verschiedenster Oberflächen genutzt werden.

Die Tn5-Integration in dem Metallionenefflux-RND-Transporter (PP0043) aus KT2440 wirkte sich ebenfalls auf die geißelgesteuerte Bewegung aus, so dass die Mutante zwar Geißeln (s. 3.1.9.2) und auch das Geißelfilament FliC bildete (s. 3.1.9.1), aber unbeweglich war. Recht und Mitarbeiter beschrieben für das Gram-positive Bakterium *Mycobacterium smegmatis* eine Mutante mit Defekt in einem Membrantransportprotein mit Ähnlichkeit zur RND-Superfamilie, die keinen Biofilm bildete und die Fähigkeit zum Gleiten verloren hatte. Der Stamm konnte aufgrund der Mutation ein hydrophobes Glykopeptidprotein, das die äußere Kapselschicht des Bakteriums darstellt, nicht transportieren. Die resultierende hydrophile Kapsel verhinderte nun einerseits die Adhäsion an die hydrophobe Oberfläche der Mikrotiterplatte, andererseits wurde die Interaktion mit einer hydrophilen Agaroseoberfläche gefördert, so dass die Mutante auf dieser nicht gleiten konnte (Recht *et al.*, 2000). Mitglieder der RND-Superfamilie katalysieren allgemein den Substratefflux aus der Zelle über einen Wasserstoffionen-Antiportmechanismus. Möglich wäre es, dass durch die Tn5-Integration im RND-Effluxtransporter PP0043 weniger Wasserstoffionen über die Membran transportiert werden, was zu einer Herabsetzung des Protonenpotentials führen könnte, welches somit nicht für die Geißelbewegung genutzt werden kann.

Transkriptionsfaktor

Weiterhin wurde eine Transposonintegration in einer ATP-abhängigen RNA Helikase (PP1868) gefunden. In *Lactobacillus reuteri* charakterisierten Roos und Mitarbeiter ein Protein mit Homologie zur RNA Helikase "DEAD box" Familie und stellten fest, dass es für die Autoaggregation (Zusammenlagerung von Zellen) des Organismus essentiell ist, was für die Kolonisierungsfähigkeit ein wichtiger Faktor sein kann (Roos *et al.*, 1999; Kolenbrander, 1995).

Beweglichkeit

Die Fähigkeit zur Bewegung ist für viele pathogene als auch für nicht-pathogene Mikroorganismen eine wichtige Voraussetzung für die Besiedlung von abiotischen und biotischen Oberflächen (de Weger *et al.*, 1987, O'Toole und Kolter, 1998 b; Pratt und Kolter, 1998). Die Tn5-Integration in Gene des Geißelmotors von *P. putida* KT2440 hatte zum einen eine Herabsetzung der Adhäsionsfähigkeit zur Folge (s. 3.1.8), zum anderen führte sie bei Integration in das *fliM* (PP4358) zur herabgesetzten Beweglichkeit bzw. bei Integration in das *fliG* (PP4368) zur Unbeweglichkeit des jeweiligen Stammes (s. 3.1.9).

Der bakterielle Geißelmotor ist im wesentlichen für die gerichtete Geißelrotation notwendig. Einige strukturelle Proteine wie FliG, FliM und FliN werden jedoch auch für die Verankerung des Geißelfilaments benötigt und sind somit am Geißelaufbau beteiligt (Irikura *et al.*, 1993). Die Tn5-Integration in das *fliG* bzw. in das *fliM* des Geißelmotors führte gegenüber dem Wildtyp zur herabgesetzten Synthese des Geißelfilaments FliC (s. 3.1.9.1). Die elektronenmikroskopische Untersuchung (s. 3.1.9.2) der entsprechenden *fliG*-Mutante zeigte unbegeißelte Zellen. Untersuchungen der Funktionen von *fliG* und *fliM* in *E. coli* und *Salmonella* ergaben, dass ca. 2/3 des N-Terminus im *fliG* für den Geißelaufbau wichtig sind, während in *fliM* die C-terminale Region am Geißelaufbau beteiligt und die mittlere Region für die Rotation verantwortlich ist (Lloyd *et al.*, 1996; Toker *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 2000). Das Transposon integrierte in den jeweiligen *P. putida* KT2440-Mutanten im 304 Aminosäure großen FliG in Position 137 (s. Abb. 4.2) bzw. im 322 Aminosäure großem FliM in Position 157 (s. Abb. 4.3). Die für *E. coli* und *Salmonella* beschriebenen Phänotypen finden sich auch in KT2440 mit der unbeweglichen und unbegeißelten *fliG*-Mutante sowie der *fliM*-Mutante mit herabgesetzter Beweglichkeit, aber vollständig gebildeter Geißel wieder.

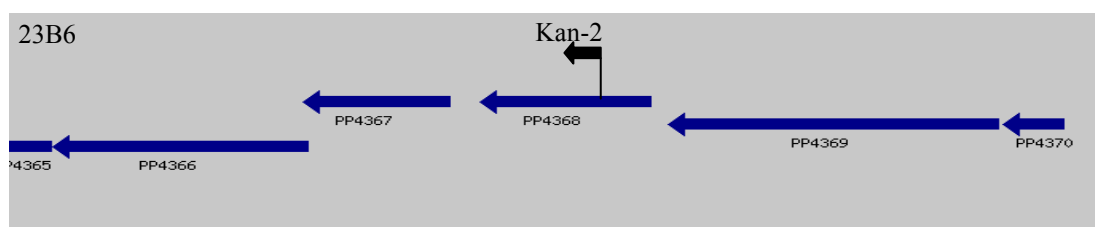


Abb. 4.2 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "flagellar motor switch protein FliG" (PP4368) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4265: flagellar protein FliJ; PP4366: flagellum specific ATP-synthase FliJ; PP4367: flagellar assembly protein FliH; PP4369: flagellar basal body M-ring protein FliF; PP4370: flagellar hook basal-body complex protein FliE)

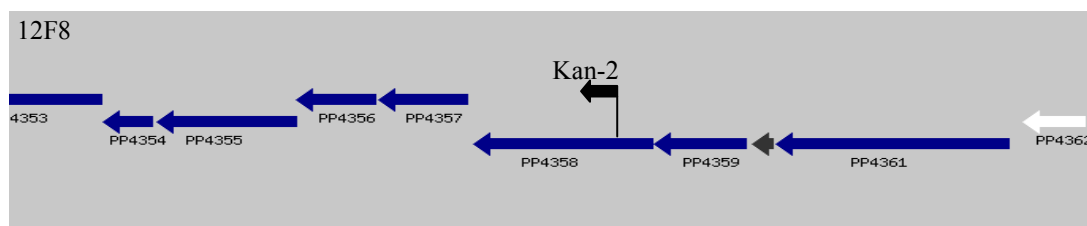


Abb. 4.3 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "flagellar motor switch protein FliM" (PP4358) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4253: flagellar biosynthetic protein FliR; PP4354: flagellar biosynthetic protein FliQ; PP4355: flagellar biosynthetic protein FliP; PP4356: flagellar assembly protein FliO; PP4357: flagellar motor switch protein FliN; PP4359: flagellar protein FliL; PP4360: hypothetical protein; PP4361: flagellar hook-length control protein FliK; PP4362: conserved hypothetical protein)

In *E. coli* und *P. aeruginosa* sind Pili für die initiale Adhäsion an Oberflächen essentiell (Pratt und Kolter, 1998; O'Toole und Kolter, 1998 b). Sauer und Mitarbeiter beobachteten ebenfalls bei der initialen Biofilmbildung an Silikonschläuche in *P. putida* die Synthese von Pili (Sauer *et al.*, 2001). In diesem Screening wurden hingegen von *P. putida* KT2440 keine adhäsionsdefekten Mutanten mit Integration in Pili-Genen gefunden (TypI-Pili: PP1889-PP1891; TypIV-Pili: PP0607; PP0611; PP0632-PP0634; PP0851; PP2357-PP2363; PP4988-PP4992; PP5080-PP5083; PP5093). Bei Untersuchungen zur Adhäsion in einem ähnlichen Testsystem (Mikrotiterplatten) wurden auch für *P. fluorescens* WCS365 keine Mutanten detektiert, die einen Defekt in der TypIV-Pili Synthese aufwiesen (O'Toole und Kolter, 1998 a). Dieser *Pseudomonas*-Stamm ist im Gegensatz zu *P. aeruginosa*, wahrscheinlich nicht zur oberflächen-assoziierten Fortbewegung ("Twitching motility") in der Lage, die durch TypIV-Pili vermittelt wird (Darzins, 1994; O'Toole *et al.*, 2000). Möglich wäre, dass diese Gene in *P. putida* KT2440 unter den genannten Testsystem für die Adhäsion nicht relevant waren und daher keine Mutanten identifiziert wurden oder mit der Zahl der untersuchten Mutanten (3500) nicht erfasst worden waren.

Biosynthesegen für Cofaktoren

Eine Tn5-Integration in dem *pqqB* (PP0379), das für ein Coenzym PQQ Syntheseprotein kodiert, führte dazu, dass die Mutante besser als der Wildtyp an die Polystyroloberfläche adhäsionierte und einen Biofilm bildete (s. 3.1.8). Pyrroloquinolinquinon (PQQ) ist eine nicht-kovalent gebundene prosthetische Gruppe von Quinoproteinen (z. B. Alkoholdehydrogenasen, Methanoldehydrogenasen, Glucosedehydrogenasen), die als Wassertoff- und Elektronenüberträger Reaktionen in Gram-negativen Bakterien katalysiert (Goodwin und Anthony, 1998). Inwieweit eine fehlende oder herabgesetzte PQQ-Synthese zur besseren Adhäsion an die Oberfläche

der Mikrotiterplatte beitrug, bleibt spekulativ. Möglich wäre eine direkte Beteiligung von PQQ an der Biofilmbildung, eine andere Annahme wäre, dass infolge der fehlenden oder herabgesetzten PQQ-Synthese die Glucosedehydrogenase keine Aktivität zeigt wie das auch für *P. fluorescens* CHAO beschrieben wurde (Schnider *et al.*, 1995). Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Glucose in Gluconat, welches über den Entner-Doudoroff-Weg abgebaut wird. Bei einer inaktiven Glucosedehydrogenase kann KT2440 Glucose nur noch über die Glycolyse verwerten, bei der kein Gluconat als Produkt auftritt. Gluconat könnte eine pH-Wert Veränderung im Medium bewirken, die sich negativ auf die Biofilmbildung auswirkt. Fehlt Gluconat wäre es möglich, dass die Bakterien infolge einer Veränderung des pH-Werts, der sich ähnlich wie ein unterschiedliches Nährstoffangebot auf die Biofilmbildung auswirken kann, besser an die Oberfläche der Polystyrolmikrotiterplatte heften und einen Biofilm bilden könnten.

Biotische Oberfläche

Die Fähigkeit zur Adhäsion an biotischen Oberflächen wurde an Weizenkeimlingswurzeln in Pflanzennährlösung durchgeführt (s. 3.1.10). In diesem Experiment wurde die relative Besiedlung der jeweils eingesetzten Mutante im direkten Vergleich zum Wildtyp ermittelt, d. h. beide Stämme (Wildtyp und Mutante) wurden in einem Ansatz (in Konkurrenz zu einander) inkubiert. Hierdurch konnte auf Bezugsparameter wie der Ermittlung des Wurzelgewichts oder der Wurzellänge verzichtet werden, die für eine separate Inokulierung unumgänglich gewesen wäre. Die aus dem biotischen Ansatz erhaltenen Ergebnisse können nur in Relation zur Konkurrenz mit dem Wildtypstamm interpretiert werden. Ein direkter Bezug der Versuchsanordnung vom abiotischen zum biotischen ist somit nur eingeschränkt möglich, da im abiotischen System lediglich mit einem Stamm gearbeitet wurde, also keine Konkurrenz bestand.

Bisher wurden lediglich zwei Stämme (23B6 und 1G7), mit Tn5-Integration in dem *fliG* bzw. Oberflächenadhäsionsprotein PP0806 zur Konkurrenzbesiedlung mit dem Wildtyp eingesetzt (s. 3.1.10).

Die ermittelten Daten zeigten (s. 3.1.10; Abb. 3.11), dass die Tn5-Integration in dem *fliG*, nicht nur für eine herabgesetzte Adhäsion an biotischen Oberflächen verantwortlich war, sondern auch dazu führte, dass die relative Besiedlung der Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant niedriger ausfiel. Die Vermutung liegt nahe, dass der Wildtyp aufgrund seiner Beweglichkeit die Weizenkeimlingswurzel eher erreicht

und diese damit effizienter als die Mutante kolonisieren konnte. Auch in *P. fluorescens* WCS374 waren unbewegliche Mutanten nicht zur Kolonisierung von Kartoffelwurzeln in der Lage (de Weger *et al.*, 1987). Turnbull und Mitarbeiter beschrieben ebenfalls in *P. putida* PaW8 die Notwendigkeit zur Bewegung als Voraussetzung für eine effiziente Besiedlung von Weizenwurzeln (Turnbull *et al.*, 2001 a). In *P. fluorescens* SBW25 hingegen waren nicht-bewegliche Mutanten durchaus in der Lage Weizenwurzeln in einem Nährlösungssystem ebenso effizient wie der Wildtyp zu besiedeln, im unsterilen Boden überlebten die Mutanten allerdings nicht (Turnbull *et al.*, 2001 b). Die gefundenen und beschriebenen Resultate machen deutlich, dass die Besiedlung von Oberflächen abhängig von der Art der Oberfläche (Pflanzentyp), dem Mikroorganismus sowie der Umgebung (Boden, Pflanzennährlösungssystem) sein können.

Die Tn5-Integration in einem Gen, das für ein Oberflächenadhäsionsprotein (PP0806) kodiert, hatte in diesem Kolonisierungsexperiment keinen negativen Einfluss auf die Konkurrenzbesiedlung. Die relative Anzahl an koloniebildenden Einheiten ("colony forming units"; CFU) für den Wildtyp und den Mutantenstamm war identisch (s. 3.1.10). So scheint dieses Protein für die Anheftung an Maissamen essentiell zu sein (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000), jedoch für die Kolonisierung von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtyp eine verzichtbare Funktion zu haben.

4.1.2 Auswirkung von Mutationen auf die Synthese und/oder Ausscheidung von Pyoverdinen in *P. putida* KT2440

Das Element Eisen gehört zu den 12 Makroelementen in der Natur und ist wichtiger Bestandteil von Redoxsystemen wie Cytochromen und Ferredoxinen, Cofaktoren von Enzymen (wie z. B. Dehydrogenasen, Hydrogenasen) sowie Eisen-Schwefel-Proteinen. Bakterien benötigen ca. 0,3-1,8 μM Eisen zum optimalen Wachstum. Unter anaeroben (reduzierenden) Bedingungen liegen Fe^{2+} -Ionen in Form löslicher Salze vor, die von Mikroorganismen direkt aufgenommen werden können. Unter aeroben Bedingungen und neutralem pH-Wert (im Boden: $<0,1 \mu\text{M}$, Säugetierzellen: 10^{-9} M) liegt Eisen jedoch als Fe^{3+} -Ion in Form von Eisenoxihydroxid (FeOOH) als unlöslicher Komplex (10^{-18} M) vor (Braun und Killmann, 1999). Die extrem niedrige Löslichkeit zwingt somit besonders aerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen, Strategien zur Aufnahme und zum Transport dieses lebenswichtigen Elements zu entwickeln, um bestimmte Habitate besiedeln zu können. Hierzu gehört die Produktion und Ausscheidung eisenbindender Komponenten (Siderophore), die direkte Nutzung und Aufnahme eisenbindender Proteine von Wirtsorganismen (Cornelissen und Sparkling,

1994), die Reduktion unlöslicher Fe^{3+} -Ionen zu löslichen Fe^{2+} -Ionen (Coulanges *et al.*, 1997), der enzymatische Abbau eisenbindender Komponenten wie Transferrin (Wolz *et al.*, 1994) oder die Produktion von Exotoxinen zum Eisentransport (Bjorn *et al.*, 1978). Eine große Vielfalt an niedermolekularen Eisenchelatoren (Siderophore) wird von Bakterien, aber auch Pilzen unter Eisenlimitierung synthetisiert und ausgeschieden. Diese eisenbindenden Chelatoren bilden mit den Fe^{3+} -Ionen stabile, wasserlösliche Komplexe, die von der Zelle durch spezielle Fe^{3+} -Siderophorrezeptoren aufgenommen und bis ins Cytoplasma transportiert werden. Dort werden sie zu Fe^{2+} -Ionen reduziert und stehen in dieser Form zellulären Prozessen zur Verfügung (Braun und Killmann, 1999).

Die intrazelluläre Eisenkonzentration wird in Gram-negativen Bakterien über das Fur-Protein ("ferric uptake regulator") sowie verschiedene Fur-gesteuerte alternative Sigma-faktoren (z. B. PvdS, PflI) reguliert. Fur ist ein klassischer prokaryotischer Aporepressor, der Eisen(II)ionen (Korepressor) zur Bindung an die Zielsequenz ("Fur oder Iron box") in der Promotorregion eisenregulierter Gene benötigt und als Fur- Fe^{2+} -Komplex deren Transkription blockiert, bis eine bestimmte Schwelle an Fe^{2+} -Ionen in der Zelle erreicht ist. Unter Eisenmangel dissoziiert der Fur- Fe^{2+} -Komplex, löst sich vom Promotor, so dass die Transkription eisenregulierter Gene wie z. B. Gene für die Siderophorsynthese oder Eisenaufnahme erfolgen kann (s. Abb. 4.4; Escolar *et al.*, 1999). Zu den direkt und indirekt Fur-regulierten Genen gehören aber auch solche, die in die verschiedensten zellulären Prozesse involviert sind wie z. B. die Chemotaxis, die Synthese von Toxinen und anderen Virulenzfaktoren, der Krebszyklus oder die oxidative Stressantwort (Escolar *et al.*, 1999; Vasil und Ochsner, 1999).

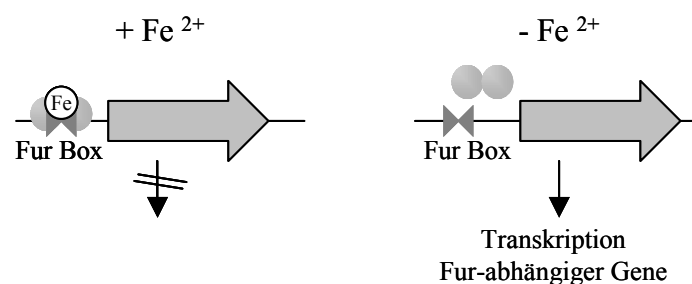


Abb. 4.4 Schematische Abbildung zur Fur-regulierten Transkription
(Die Abbildung wurde modifiziert nach Ambrosi *et al.*, 2002 angefertigt)

Sogenannte fluoreszierende Vertreter der Gattung *Pseudomonas* bilden Pyoverdine oder Pseudobactine, grün-gelb fluoreszierende Pigmente, die die größte Klasse der Siderophore dieser Bakteriengattung darstellen. Hierbei handelt es sich um kleine, lineare oder zyklische Peptide, die in einem ribosomal-unabhängigen Vorgang unter Eisenlimitierung von spezifischen Synthetasen ("non-ribosomal peptide synthetase"; NRPS) gebildet werden (Crosa und Walsh, 2002). Pyoverdine (s. Abb. 4.5) bestehen aus drei verschiedenen strukturellen Bausteinen: (1) dem gemeinsamen Strukturelement aller Pyoverdine, dem Dihydroxychinolinchromophor, (2) einer Acylseitenkette, die über NH_2 -Gruppen mit dem Chromophor verbunden ist sowie (3) der stammspezifischen Peptidkette, die aus sechs bis 12 Aminosäuren aufgebaut und über ihren N-Terminus mit der Carboxylgruppe des Chromophors verbunden ist. Das Chromophor und die Peptidkette bilden die Fe^{3+} -komplexierenden Elemente. Die Peptidkette ist ebenfalls an der Erkennung und Bindung des Eisenkomplexes an den Ferripyoverdinrezeptor in der äußeren Membran beteiligt. Da die Peptidketten die variablen Bereiche der Pyoverdine darstellen, werden diese Moleküle zur Stammdifferenzierung der *Pseudomonas sensu stricto*-Gruppe mittels isoelektrischer Fokussierung ("Siderophortyping") eingesetzt (Meyer *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002).

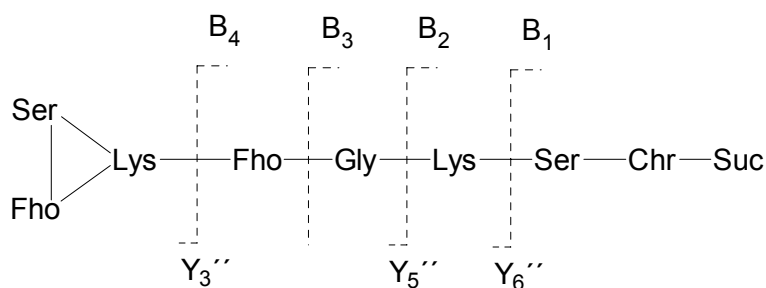


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der Struktur des Pyoverdins aus *P. putida* KT2440

(Die Struktur des von KT2440 synthetisierten Pyoverdins wurde in der Arbeitsgruppe von Meyer identifiziert. Ser: Serin, Fho: Formylhydroxyornithin; Lys: Lysin; Gly: Glycin; Chr: Chromophor; Suc: Succinat; B1-B4; Y3-Y6: Seitenketten)

P. putida KT2440 ein Vertreter der rRNA-Gruppe I (*Pseudomonas sensu stricto*) benötigt ebenso wie andere aerob lebende Mikroorganismen Eisenionen und scheidet Pyoverdin unter Eisenlimitierung aus. Da die Synthese, Ausscheidung auf Aufnahme eisenbindender Chelatoren besonders für die Besiedlung der Rhizosphäre wichtig ist, wurde die *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutantenbibliothek auf Mutanten hin untersucht, die unter Eisenlimitierung keine Pyoverdine produzierten oder ausschieden (s. 1, s. 3.1.7). Mittlerweile wurden ca. 30 Gene identifiziert, die mit der Siderophorbildung in der rRNA-Gruppe I der Gattung *Pseudomonas* in Zusammenhang

stehen, wobei der Pyoverdinsyntheseweg am besten in *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC15692) aufgeklärt ist (Meyer *et al.*, 1999; Massialos *et al.*, 2002).

Die Identifizierung der transposonflankierenden Region der pyoverdinnegativen *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten ergab, dass Proteine mit unterschiedlichen zellulären Aufgaben betroffen waren, was die Vielfalt der in die Synthese der Pyoverdine involvierten Enzyme verdeutlicht. Bei einigen Genen führte die Tn5-Integration nicht nur zu einer Beeinträchtigung der Siderophorbiosynthese und/oder -ausscheidung (s. 3.1.7), sondern zusätzlich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress. So reagierten die betroffenen Mutanten in konzentrationsabhängiger Weise empfindlich auf Wasserstoffperoxid (s. 3.1.7.1). Durch Southernhybridisierung wurde festgestellt, dass das Tn5 nur einmal ins Genom integrierte (s. 3.1.4). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der erhaltene komplexe Phänotyp auf die Integration in jeweils einem der an der Siderophorsynthese bzw. -ausscheidung beteiligten Gene zurückgeführt werden kann. Da allerdings keine Mutante in dieser Arbeit komplementiert wurde, sind polare Effekte auf "downstream" oder "upstream" des betroffenen Integrationsortes liegende Gene nicht auszuschließen.

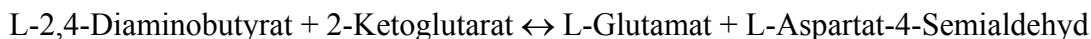
Peptid- und Pyoverdinsynthetasen

Die Synthese des peptidischen Rückgrats von Pyoverdinen erfolgt in einem ribosomal unabhängigen Mechanismus, an dem Peptidsynthetasen beteiligt sind (Quadri, 2000; Crosa und Walsh, 2002). Diese nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen bestehen aus verschiedenen Domänen, die an der Aktivierung, Kondensation und Termination der Pyoverdinsynthese mitwirken. Mutanten mit Defekten in Genen, die für Peptidsynthetasen kodieren, können keine Siderophore synthetisieren (Devescori *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden zwei transposonflankierenden DNA-Regionen Genen zugewiesen, die für eine Pyoverdinsynthetase (PP4243; s. Abb. 7.6) bzw. eine nicht-ribosomale Siderophorsynthetase (PP4219; s. Abb. 7.7) kodieren und für diese Enzyme wichtige Domänen (u. a. Adenylierungsdomäne, Kondensationsdomäne) beinhalten. Die Pyoverdinsynthetase (PP4343) zeigte 67 % Ähnlichkeit zu Pyoverdinsynthetasen aus *P. fluorescens* ATC17400 (PvsA) und aus *P. aeruginosa* (PvdL). Mossialos und Mitarbeiter vermuten, dass diese Pyoverdinsynthetasen in die Chromophorbiosynthese der Siderophore involviert sind (Mossialos *et al.*, 2002). Die vorhandene Ähnlichkeit der Pyoverdinsynthetase (PP4343) aus *P. putida* KT2440 mit diesem Enzym lässt vermuten, dass PP4343 in die Chromophorbiosynthese involviert ist.

In dem Stamm P25E7 integrierte das Tn5 in einen nicht kodierenden Bereich, der zwischen dem Gen für ein periplasmatisches Bindeprotein (PP4245) und einem Gen für ein putatives Siderophorbiosyntheseprotein (PP4246) liegt. Da das Transposon in *trans* nahe dem N-Terminus des Siderophorsyntheseproteins integrierte, kann daraus geschlossen werden, dass die Transkription von PP4246 gestört ist und daher keine Siderophorsynthese erfolgte (s. Abb. 7.4).

Transaminase

Eine weitere Tn5-Integration erfolgte in einem Diamino-butyrat-2-oxoglutarat-Transaminasegen (PP4223), dessen Genprodukt dem zentralen Intermediärstoffwechsel zugeordnet wird (s. Abb. 4.6). Siderophore werden aus Zellmetaboliten, inklusive Aminosäuren gebildet. Für die Synthese der chromophoren Gruppe des Pyoverdins aus *P. aeruginosa* PAO wird ein Kondensationsschritt der Aminosäure D-Tyrosin mit L-2,4-Diaminobutyrat (Dab) postuliert (Budzikiewicz, 1993; Meyer, 2000). Die Diaminobutyrat-2-oxoglutarat Transaminase katalysiert folgende Reaktion:



Das Vorhandensein des Bausteins L-2,4-Diaminobutyrat schien für eine vollständige Pyoverdinsynthese in KT2440 essentiell zu sein. Der Verlust der Fähigkeit zur Pyoverdinsynthese bei einem Defekt im PP4223 unterstreicht diese Annahme.

Interessanterweise weist das genannte Enzym eine 78 %-ige Ähnlichkeit zum RhbA-Protein aus *Sinorhizobium meliloti* auf. Das *rhbA* ist das erste Gen eines Operons auf dem Megaplasmid pSyma, das für die Regulation, die Biosynthese sowie den Transport von Rhizobactin 1021 verantwortlich ist, dem von *S. meliloti* unter Eisenmangel synthetisierten Siderophor (Lynch *et al*, 2001). Für *S. meliloti* ist die o. g. Reaktion der erste Schritt in der Biosynthese von Rhizobactin 1021, das strukturelle Ähnlichkeiten zum Aerobactin aus *E. coli* aufweist. Mutanten mit Defekt im *rhbA*-Gen produzierten kein Rhizobactin 1021, konnten jedoch dieses Siderophor aufnehmen.

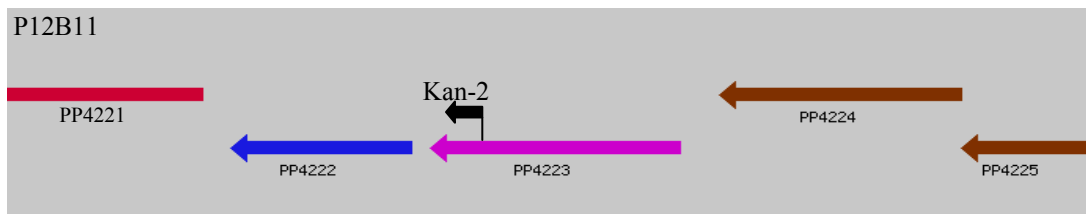


Abb. 4.6 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette in der "diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase" (PP4223) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4221: non-ribosomal peptide synthetase; PP4222: syrP protein; PP4224: sensor histidine kinase; PP4225: DNA-binding response regulator)

CcmF

Die Transposonintegration in dem Cytochrom C-Typ Biogenese Protein CcmF (PP4322) verursachte einen pyoverdinnegativen Phänotyp. Die Mutante wies keine Cytochromoxidaseaktivität auf und war empfindlich gegenüber Wasserstoffperoxid.

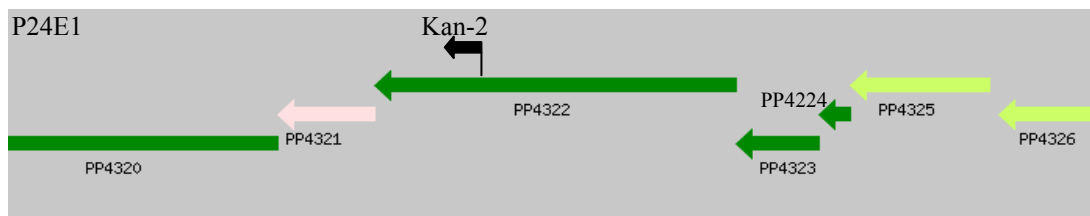


Abb. 4.7 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "cytochrome c-type biogenesis protein CcmF" (PP4322) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4320: cytochrome c-type biogenesis protein CcmH, authentic frameshift; PP4321: thiol:disulfide interchange protein DsbE; PP4323: cytochrome c-type biogenesis protein CcmE; PP4324: cytochrome c-type biogenesis protein CcmD; PP4325: heme ABC export system, permease protein CcmC; PP4326: heme ABC export system, permease protein CcmB).

Das *ccmF* ist Bestandteil eines Genclusters (PP4327-PP4320), das das Bakterium zur C-Cytochrombiosynthese nutzt. C-Cytochrome sind Hämproteine, die am Elektronentransport von Pro- und Eukaryoten beteiligt sind. Wesentliche Schritte in der Biogenese der C-Cytochrome sind der Export des Cytochrom-Vorläufers über die Cytoplasmamembran und die nachfolgende Verknüpfung mit der funktionellen Hämgruppe. Die Funktionen der Proteine, die an diesem Prozess beteiligt sind, wurden bisher in *E. coli* am besten charakterisiert. Hierbei bilden die Komponenten CcmA und CcmB wahrscheinlich einen ABC-Transporter, der in der Translokation von Häm über die Plasmamembran involviert ist (Goldman und Kranz, 2001; Ren *et al.*, 2002). CcmC, CcmD und CcmE, drei Membranproteine, interagieren miteinander und führen den Transport von Häm weiter ins Periplasma. Die Proteine CcmF und CcmH bilden wahrscheinlich Untereinheiten der Cytochrom C-Lyase und fördern den Transfer vom Häm auf das Apocytochrom C.

Für die Synthese des Pyoverdins bzw. dessen Chromophoreinheit aus *P. aeruginosa* PAO1 beschrieben Stintzi und Mitarbeiter das *pvcD*, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu Proteinen der Cytochrom C-Familie zeigte (Stintzi *et al.*, 1999). Aus diesen Ergebnis und den von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Mutationen in Ccm-Operonen verschiedener Bakterien, die zu Defekten in der Siderophorsynthese oder -ausscheidung führten (Gaballa *et al.*, 1996; Yeoman *et al.*, 1997; Pearce *et al.*, 1998; Page und Ferguson, 1999) wurde gefolgert, dass für die Chromophorsynthese Cytochrom c bzw. ein Cytochrom C vermittelter Elektronentransfer benötigt wird. Somit kann die Involvierung von Cytochrom c in die Pyoverdinsynthese von KT2440 ebenfalls für

dieses Bakterium angenommen werden. Infolge einer evt. fehlenden Cytochrom C-Lyase Aktivität würde der Transfer vom Häm auf das Apocytochrom C nicht stattfinden, so dass kein funktionsfähiges Cytochrom c gebildet würde, was neben der fehlenden Siderophorbildung auch die fehlende Cytochromoxidaseaktivität (s. 2.2.7, s. 3.1.7) in der Mutante unterstreicht.

Interessanterweise charakterisierten de Vrind und Mitarbeiter hingegen *ccmF*-Mutanten in *P. putida* GB-1, die zur Synthese und dem Export von Pyoverdinen bei Wachstum in CAA-Medium unter Eisenlimitierung in der Lage waren. Auffällig war hier, dass die *ccmF*-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp auch in eisengesättigtem Milieu Siderophore ausschieden. In diesen Mutanten kam es zur Überproduktion von Hämvorläufern, die für die Bindung der Eisenionen verantwortlich waren, somit einen Zustand von Eisenmangel vortäuschten und in der Folge die Siderophorsynthese angeregt wurde (de Vrind *et al.*, 1998).

Die Tn5-Integration in dem *ccmF* wirkte sich zusätzlich auf die Reaktivität der Mutante gegenüber oxidativem Stress aus. Im Gegensatz zum Wildtypstamm zeigte die Mutante P24E1 schon bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 2 mM vermindertes Wachstum (s. 3.1.7.1). Die erhöhte Sensitivität könnte in einer Inaktivierung der Katalase und/oder Peroxidase, Enzyme, die für die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid in der Zelle wichtig sind, begründet sein. In *P. aeruginosa* PAO1 werden die Operone für Bacterioferritine (*bfr*) und Katalase(*kat*)/Peroxidase-(*aphA*)(*bfrA-katA*; *bfrB-aphA*) neben dem *katB* unter oxidativen Stress ausgelöst durch Wasserstoffperoxid exprimiert (Brown *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1999). In PAO1 stellt das Bacterioferritin A, ein Eisenspeicherprotein (auch bekannt als Cytochrom _{b1} oder Cytochrom _{b557}), das Eisen für die hämabhängige Katalase A zur Verfügung (Ma *et al.*, 1999). Die Proteine kommen sowohl im Cytoplasma als auch Periplasma vor. In KT2440 findet sich die gleiche Organisation wie in PAO1 für Bacterioferritin (PP0482)-KatA(PP0481) sowie für ein weiteres Bacterioferritin *bfr* (PP1082)-AhpC-ähnliches Protein (PP1084). Das Cytochrom C könnte eine Funktion in der Hämsynthese in KT2440 haben, so dass die hämabhängigen Enzyme infolge der fehlenden Cytochrom C-Biosynthese nicht aktiv sind. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Bacterioferritin ein Cytochrom c darstellt und infolge der fehlenden Cytochrom C-Biogenese den Detoxifizierungsenzymen der "Eisenlieferant" fehlt.

NusB

Die Tn5-Integration in dem *nusB* verursachte einen pleiotrophen Phänotyp in der Mutante P6G4 (s. Abb. 4.8). Diese zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine abgeschwächte Fluoreszenz, eine herabgesetzte geißelgesteuerte Beweglichkeit und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress. Das NusB ("N utilizing substance protein B") gehört zu den N-Proteinen, die bei Untersuchungen zur Genregulation im λ -Phagen entdeckt wurden. Dieser bedient sich der Antitermination als Mechanismus für den Übergang vom lysogenen in den lytischen Zyklus. Als Antitermination wird ein Prozess verstanden, bei dem die RNA-Polymerase bei der DNA-Transkription spezifische RNA-Sekundärstrukturen überliest, die normalerweise die Transkription terminieren. Die N-Proteine stehen in Zusammenhang mit der Regulation der ribosomalen RNA-Biosynthese in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Taura *et al.*, 1992; Gopal *et al.*, 2000). Bisher charakterisierte *nusB*-Mutanten in *E. coli* zeigten ein verzögertes Wachstum, waren temperatursensitiv bei 20 °C oder verringerten die Transkriptionsraten (Taura *et al.*, 1992; Zellars und Squires, 1999). Diese Ergebnisse wie auch der in dieser Arbeit gefundene pleiotrophe Phänotyp wiesen auf eine Inaktivierung von *nusB* hin, die sich durch Veränderungen in auf die Transkription verschiedener Gene auswirkte. Bei der Mutanten P6G4 sind die Siderophorsynthese/-ausscheidung, die Beweglichkeit sowie die Reaktion auf toxische Substanzen in Form von Wasserstoffperoxid betroffen. Taura und Mitarbeiter postulierten ebenfalls eine mögliche Involvierung von NusB in die Proteinbiosynthese, so dass hierdurch veränderte Parameter die gezeigten Phänotypen zur Folge hätten (Taura *et al.*, 1992).

In der Arbeitsgruppe von Vasil wurde eine Homologie des NusG, ebenfalls ein N-Protein, zum PvdX aus *P. aeruginosa* PAO1 festgestellt. Für letzteres wird in *P. aeruginosa* eine mögliche Funktion als Transkriptionsterminator für die Transkription des Fur regulierten PvdS postuliert, das einen alternativen σ -Faktor für die Pyoverdinsynthese unter Eisenlimitierung darstellt (Vasil und Ochsner, 1999).

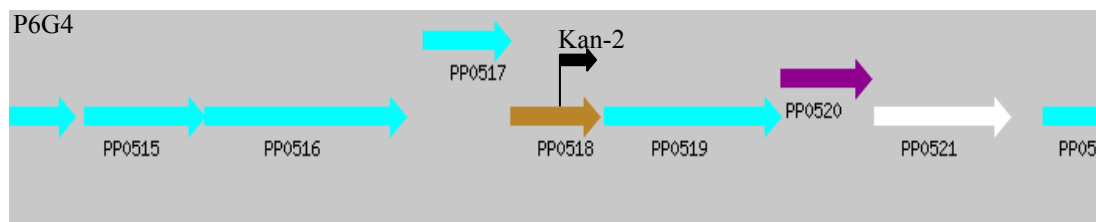


Abb. 4.8 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "N utilization substance protein B" (PP0518) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP0515: riboflavin synthase, α -subunit; PP0516: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase; PP0517: riboflavin synthase, β -subunit; PP0519: thiamine monophosphate kinase; PP0520: phosphatidylglycerophosphatase A; PP0521: conserved hypothetical protein)

Fur

Die Tn5-Integration nahe des 5'-Endes im *fur* hatte ebenfalls einen pleiotropen Phänotyp zur Folge. So zeigte die Mutante P7G3 keine Pyoverdinsynthese/-ausscheidung unter Eisenlimitierung (s. 3.1.7), reagierte empfindlich auf Wasserstoffperoxid (s. 3.1.7.1) und zeigte gegenüber dem Wildtyp eine verlängerte lag-Phase des Wachstumszyklus sowohl mit ausreichender Eisenversorgung als auch unter Eisenmangel (Dr. S. Heim, pers. Mitteilung).

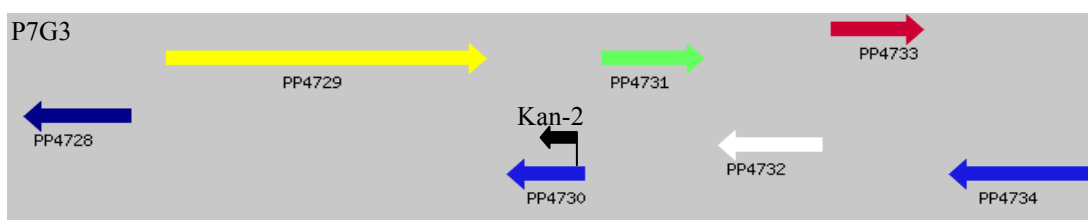


Abb. 4.9 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "ferric uptake regulator" (*fur*) (PP4730) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4728: heat shock protein GrpE; PP4729: DNA repair protein RecN; PP4731: outer membrane lipoprotein OmlA; PP4732: conserved hypothetical protein; PP4733: SsrA-binding protein; PP4734: transkriptional regulator, GntR family)

In *P. aeruginosa* kontrolliert Fur die Transkription der Synthesegene für das Siderophor Pyochelin direkt, während die Gene für die Pyoverdinsynthese indirekt über den σ -Faktor PvdS kontrolliert werden. Das zum alternativen σ -Faktor PvdS homologe Gen in *P. putida* KT2440 wird als *pfrI* bezeichnet. Es weist die höchste Ähnlichkeit zum gleichnamigen Protein in *P. putida* WCS358 auf, das als Aktivator für die Pseudobactinsynthese unter Eisenmangel in diesem Bakterium verantwortlich ist (Venturi *et al.*, 1995). In *P. putida* KT2440 gehört PfrI zu einer Untergruppen der σ^{70} -Familie, der "extracytoplasmic function family" (ECF). Einige ECF- σ -Faktoren (13) in *P. putida* KT2440 weisen Homologien zu FecI- σ -Faktoren aus *E. coli* auf, die dort mit der Regulation des Eisenhaushalts in Verbindung stehen (Enz *et al.*, 2000;

Martinez-Bueno *et al.*, 2002).

Während *fur* in einigen Mikroorganismen wie *E. coli* und *Yersinia pestis* kein essentielles Gen darstellt, sind in *P. aeruginosa* keine überlebensfähigen *fur*-Nullmutanten bekannt (Hassett *et al.*, 1996, Ochsner *et al.*, 1999). Ähnlich wie in *fur*-Mutanten von *P. aeruginosa* wurde in der *fur*-Mutante von *P. putida* KT2440 trotz Tn5-Integration Fur gebildet (Dr. S. Heim, pers. Mitteilung). Die Fur abhängige Expression der Fumarase C (FumC) schien nicht beeinflusst zu sein. Dagegen wurde der Ferripyoverdinrezeptor FvpA gegenüber dem Wildtyp unter Eisenlimitierung jedoch schwächer exprimiert (Heim *et al.*, 2003).

P. aeruginosa PAO1 *fur*-Mutanten, die keine Pyoverdine synthetisierten und ausschieden sowie solche Mutanten, in denen das Siderophor konstitutiv gebildet wurde, zeigten ebenfalls eine erhöhte Stressantwort gegenüber Wasserstoffperoxid im Vollmedium, in dem Eisenionen in Spuren vorhanden waren (Poole *et al.*, 1993; Hassett *et al.*, 1996; Vasil und Ochsner, 1999). Die in diesen Mutanten herabgesetzte Gesamtkatalase und auch Gesamt-Superoxiddismutase-Aktivität wurde mit dem fehlenden Einbau von Eisenionen in die z. T. eisenabhängigen Detoxifizierungsenzyme aufgrund der mangelnden Eisenaufnahme erklärt, die somit eine erhöhte Reaktivität gegen Wasserstoffperoxid zur Folge hatte (Brown *et al.*, 1995, Hassett *et al.*, 1996). Da die *fur*-Mutante aus *P. putida* KT2440 einen vergleichbaren Phänotyp zeigte, scheint Fur auch an der Regulation der oxidativen Stressantwort in *P. putida* KT2440 beteiligt zu sein. Die Tn5-Integration im *fur* könnte zu einem veränderten Fur-Protein geführt haben, welches seinerseits eine veränderte Funktion u. a. in Bezug auf die Transkription der Gene für die Pyoverdinsynthese und der oxidativen Stressantwort ausübt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das veränderte Fur nicht oder nur teilweise von den Fur-Boxen in der Promotorregion der Fur-abhängigen Gene, die an der Pyoverdinsynthese und der oxidativen Stressantwort beteiligt sind, dissoziierte und somit die Transkription nicht erfolgte (s. Abb. 4.4).

In der Abbildung 4.10 wurde anhand der erhaltenen Ergebnisse und aus Daten der Literatur (Stintzi *et al.*, 1999; Meyer, 2000, Massialos *et al.*, 2002) versucht, einen schematischen Ablauf der Pyoverdinsynthese in *P. putida* KT2440 und der Verknüpfung einiger Gene in die oxidative Stressantwort darzustellen.

Die Verschiedenartigkeit der Gene, die ausgelöst durch die Tn5-Integration neben einem pyoverdinnegativen Phänotyp noch einen oder mehrere andere Phänotypen zeigten, spiegelt die enge Verknüpfung von Genen wieder, die in mehreren Prozessen des Zellmetabolismus direkt oder indirekt beteiligt sind. Die gefundenen Mutanten stellen interessante Kandidaten für die Inokulierung der Rhizosphäre von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz mit dem Wildtyp dar, um zu verifizieren, inwieweit die Fähigkeit zur Siderophorbildung relevant für die Besiedlung ist oder andere Defekte wie z. B. die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress eine essentielle Rolle spielen.

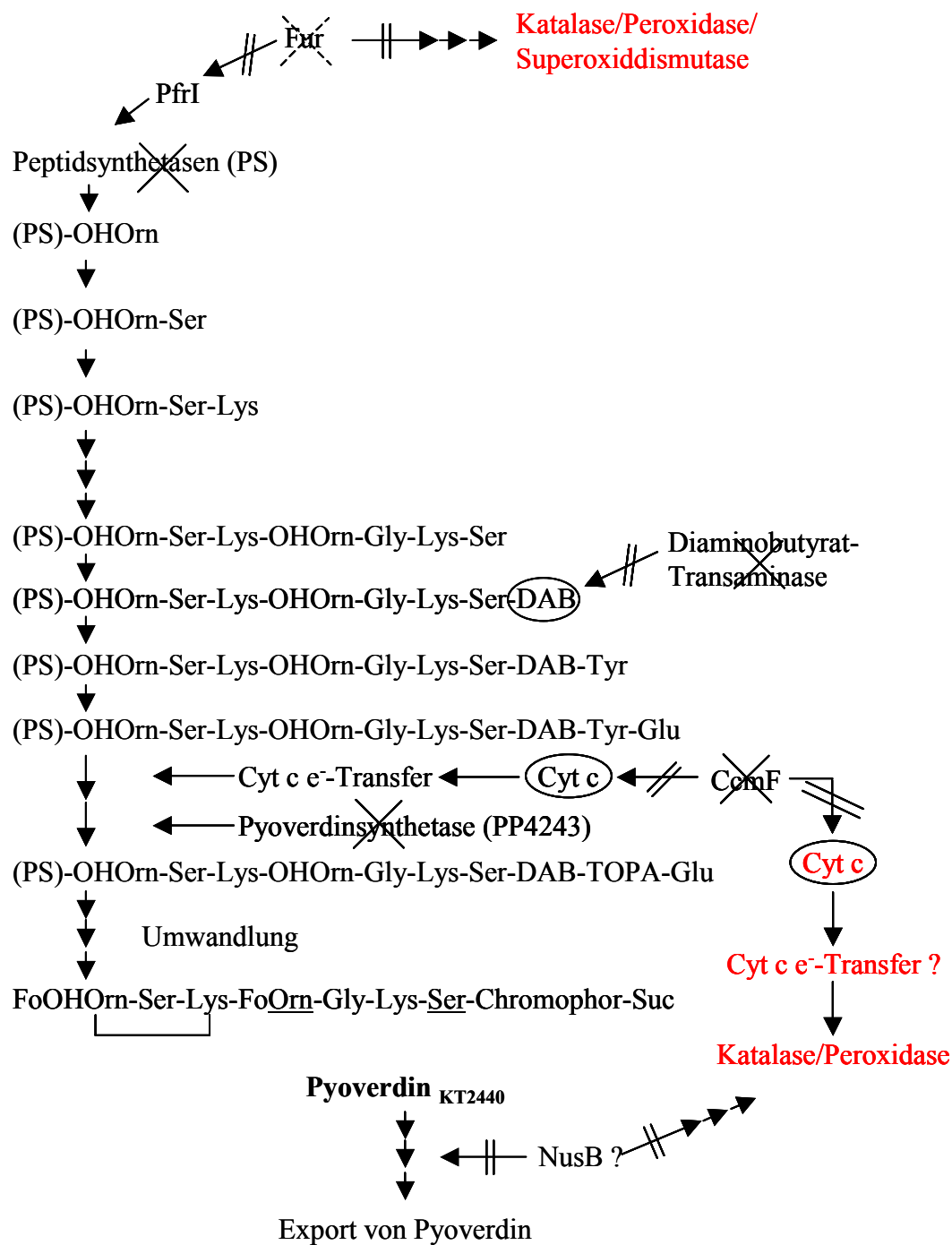


Abb. 4.10 Hypothetischer Biosyntheseweg für die Pyoverdinsynthese in *P. putida* KT2440 und postulierter Zusammenhang einiger involvierter Gene in die oxidative Stressantwort

Diese Abbildung wurde in Anlehnung des hypothetischen Biosyntheseweges für das Pyoverdin aus *P. aeruginosa* PAO1 angefertigt (Stintzi *et al.*, 1999; Meyer, 2000; Massialos *et al.*, 2002). Die Biosynthese beginnt mit der Verknüpfung von δ -N-Hydroxyornithin (OHOrn) mit einer Peptidsynthetase und wird durch Verknüpfung weiterer Aminosäuren fortgeführt. Die Aminosäure Glutamat (Glu) wird in Succinat (Suc) umgewandelt. Durch Umlagerungen wie Racemerisierung, Zyklisierung etc. wird das Pyoverdin fertiggestellt und kann exportiert werden. Ser Serin, Lys Lysin, Gly Glycin, DAB Diaminobutyrat, TOPA Trihydroxyphenylalanin.

4.2 Analyse des Proteommusters von *P. putida* KT2440 beim Wachstum in der Rhizosphäre

Wenige Faktoren sind bekannt, die für das Überleben von Mikroorganismen in einem Habitat wie der Rhizosphäre wichtig sind, da dieses ökologische Areal durch viele verschiedene biotische und abiotische Faktoren beeinflusst wird. Die Besiedlung eines neuen Habitats ist mit physiologischen und metabolischen Veränderungen im Mikroorganismus verbunden. Zur Identifizierung von Genprodukten, die die Adaptation von *P. putida* KT2440 an die Rhizosphäre ermöglichen und damit für die Besiedlung des Habitats wichtig sind, wurde die differentielle Proteomanalyse mit unterschiedlichen Versuchsanordnungen zusätzlich zur genetischen Analyse der *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r) gewählt (s. 3.2). In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt der Proteomanalyse auf die Verwertung der Wurzelexudate der Weizenkeimlinge KT2440 gelegt. Schwierigkeiten bereitete die Proteomanalyse der an den Weizenwurzeln adhäsierenden Zellen, da nur wenig Zellmaterial für die Untersuchung zur Verfügung stand.

Veränderung des Proteommusters von KT2440 in der Weizenkeimlingsrhizosphäre im Vergleich zu Kontrollzellen

Bei der Adaptation bzw. Besiedlung der Rhizosphäre der Weizenkeimlingswurzeln durch *P. putida* KT2440 spiegelten sich die physiologischen Veränderungen vor allem in der differentiellen Expression von Proteinen wieder, die zur Gruppe der Transport- und Bindeproteine und des Energie- und Aminosäurestoffwechsels gehörten. Aber auch einige als hypothetisch annotierte Proteine wurden differentiell exprimiert (s. 3.2.3; s. Tab. 3.6).

Nach ca. dreitägiger Inkubation der *P. putida* KT2440-Zellen in der Rhizosphäre bzw. ohne den Einfluss von Weizenkeimlingen kam es zur schwächeren Expression in planktonischen Zellen von AapJ, einem periplasmatischen Bindeprotein. Das *aapJ* gehört zu einer L-Aminosäure Permease (Aap), die durch vier Gene (*aapJ*, *aapQ*, *aapM*, *aapP*; PP1297-PP1300) kodiert wird und zur Familie der ABC-Transporter gehört. Das Aap, das in dem Rhizobakterium *R. leguminosarum* bereits näher charakterisiert wurde, zeigt für ABC-Transporter zum einen eine hohe Affinität, aber auch eine ungewöhnlich hohe Aufnahme verschiedener L-Aminosäuren (Walshaw und Poole, 1996; Walshaw *et al.*, 1997). Aap stellt zudem nicht nur ein aktives Aufnahmesystem dar, sondern steuert auch den Aminosäureefflux unter bestimmten

Bedingungen (z. B.: bei Anreicherung einer Aminosäure in der Zelle). An beiden Prozessen sind das periplasmatische Bindeprotein AapJ so wie alle anderen Komponenten beteiligt (Walshaw und Poole, 1996). Weiterhin wird die Expression von Aap in *R. leguminosarum* durch das NtrC ("nitrogen regulation protein") negativ reguliert, d. h. bei Stickstoffmangel kommt es zur Repression. Möglich wäre, dass in den planktonischen Zellen N-Mangel vorlag, der zur schwächeren Expression von AapJ führte oder dass das System in dieser Phase nicht benötigt und aus diesem Grund schwächer als in den Kontrollzellen exprimiert wurde. Des weiteren wurde ein periplasmatisches Bindeprotein eines ABC-Transporters für Zucker (PP1015) sowie eine D-Hydantoinase (PP4036) in planktonischen Zellen schwächer als in den Kontrollzellen exprimiert. Die herabgesetzte Expression des ABC-Transporters wurde auch in planktonischen Zellen beobachtet, die mit Glucose als zusätzlicher Kohlenstoff- und Energiequelle inkubiert wurden. Das könnte darin begründet sein, dass die in den Wurzelexudaten enthaltenen Nährstoffe die Synthese eines solchen Transporters nicht erforderten. Die D-Hydantoinase oder auch Dihydropyrimidinase (PP4036) gehört zu den Amidohydrolasen (wie z. B. Alantoninase, Dihydroorotase) und katalysiert die Hydrolyse von Dihydropyrimidine und vom strukturell verwandten DL-5-monosubstituierten Hydantoin zu N-Carbamyl-D-Aminosäuren und letztlich zur entsprechenden D-Aminosäure (La Pointe *et al.*, 1994). Die höhere Expression in den Kontrollzellen könnte darin begründet sein, dass den Zellen keine Aminosäuren als Substrate zur Verfügung stehen, sie also auf die Synthese angewiesen waren.

Unter den Proteinen, die in den planktonischen Zellen hochreguliert wurden, befand sich auch die am Aminosäurestoffwechsel beteiligte Arginindeiminase (ArcA). ArcA (PP1001) ist eine Komponente des *arc*-Operons (PP0999-PP1002), das die Gene beinhaltet, die die Proteine für den Argininabbau unter Sauerstofflimitierung kodieren. Das *arcCDAB*-Operon in *P. aeruginosa* wird durch ANR ("anaerobic regulator"), dem anlogenen Protein zu FNR ("fumarate nitrate reductase regulator") in *E. coli*, und dem Regulatorprotein ArgR ("arginine repressor") reguliert (Lu *et al.*, 1999). ANR ist neben der Regulation des Arginindeiminasewegs weiterhin für die Denitrifikation und die Cyanidsynthese unter anaeroben Bedingungen in diesem Bakterium verantwortlich (Arai *et al.*, 1997). Sauer und Mitarbeiter beobachteten in 12 Tage alten Biofilmen von *P. aeruginosa* eine maximale Expression von Komponenten (ArcA, ArcB, ArcC) des *arcCDAB*-Operons (Sauer *et al.*, 2002). Ein weiterer Hinweis darauf, dass Sauerstofflimitierung in allen planktonischen Zellen vorlag, war die höhere Expression einer Alkoholdehydrogenase (PP3839), die an Fermentationsprozessen beteiligt sein könnte, die die von den Wurzelexudaten ausgeschiedenen Substanzen erforderten.

Ein interessantes Protein, das in den planktonischen Zellen (mit und ohne Glucosezusatz) und in den Kontrollzellen mit Glucose höher exprimiert wurde, wurde als hypothetisch annotiertes Protein (PP3783) identifiziert und zeigte 64 % Ähnlichkeit zum SyrB. SyrB ist an der Biosynthese des Phytotoxins Syringomycin im pflanzenpathogenem γ -Proteobakterium *P. syringae* pv. *syringae* beteiligt. In *P. syringae* pv. *syringae* BD301D stellt das zyklisches Lipodepsinnonapeptid Syringomycin den Schlüsselvirulenzfaktor dar. Die Syringomycinbiosynthese wird in vielen *P. syringae*-Stämmen durch pflanzliche Signalmoleküle (phenolische Glykoside) aktiviert; einige Stämme produzieren den Virulenzfaktor ausschließlich in Anwesenheit der Signalmoleküle (Quigley *et al.*, 1994). Das SyrB weist seinerseits Ähnlichkeiten zu Aminosäurebindedomänen peptidischer Synthetasen auf, die an Synthese peptidischer Antibiotika sowie Siderophoren beteiligt sind (Zhang *et al.*, 1995). Da in allen planktonischen Zellen sowie den Kontrollzellen von KT2440, die mit Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle inkubiert wurden, das hypothetische Protein PP3783 exprimiert wurde, könnte das Hinweis darauf sein, dass PP3783 eine Rolle in der Glucoseverwertung in diesem Bakterium spielt.

Wachstum in Wurzelexudaten im Vergleich zum Komplexmedium

In einem weiteren Experiment wurden die Veränderungen im Proteom von KT2440-Zellen, die in Wurzelexudaten gewachsen waren, mit in Komplexmedium gewachsenen Zellen verglichen (s. 3.2.4; s. Tab. 3.7). Die Inkubation fand unter aeroben Bedingungen (Schütteln) bei 30 °C über Nacht statt. Die in Komplexmedium gewachsenen Zellen erreichten hier eine optische Dichte von 1,8, die mit Wurzelexudaten kultivierten eine optische Dichte von 0,8, woraus geschlossen werden konnte, dass in den Wurzelexudaten nicht alle von KT2440 bevorzugten Nährstoffe enthalten waren.

Die identifizierten Proteine, die in den mit Wurzelexudaten inkubierten Zellen höher exprimiert wurden, gehörten zu den Transport- und Bindeproteinen, unter ihnen ABC-Transporter für Zucker sowie Komponenten von Aminosäure ABC-Transportern wie das AapJ (PP1297) und das BraC (PP1141). In *R. leguminosarum* wird die Aminosäureaufnahme durch zwei ABC-Transporter dominiert; der allgemeinen Aminosäure Permease (Aap) sowie einer zweiten Aminosäure Permease mit einer breiten Substratspezifität, die Ähnlichkeit zu Transportern für verzweigte Aminosäuren aufweist (Bra_{RI}, "branched-chain amino acids") (Hosie *et al.*, 2002). Beide Aminosäure ABC-Transportsysteme unterscheiden sich von anderen ABC-Transportern durch ein lösliches Bindeprotein ("solute binding protein", SBP) zusätzlich zu den integralen

Membrandomänen und ATP-Bindedomänen. Diese SBP ABC-Transporter sind für die Aufnahme von Aminosäuren, Metallionen sowie Zuckern verantwortlich und können diese löslichen Substanzen auch bei großem Konzentrationsgefälle (> 10000 fach) in der Zelle akkumulieren (Higgins, 1992). Es gibt zwei große Klassen von ABC-Transportern für Aminosäuren: die Transporter polarer Aminosäuren (PAAT) und die für hydrophobe Aminosäuren (HAAT). Zu ersteren gehört das Aap, zu letzteren das Bra_{PA} aus *P. aeruginosa* und das Bra_{RI} aus *R. leguminosarum* sowie und das Liv_{EC} aus *E. coli*. In *P. putida* KT2440 zeigen beide Aminosäure Permeasen eine große Ähnlichkeit zu den genannten Systemen. Rainey und Mitarbeiter identifizierten mittels IVET ebenfalls ein in der Rhizosphäre induziertes Gen aus *P. fluorescens* SBW25, das die größte Ähnlichkeit zu Genen des Liv aus *E. coli* bzw. *braCDEFG* aus *P. aeruginosa* aufwies (Rainey, 1999).

Zwei Proteine, die Arginindeiminase sowie die Alkoholdehydrogenase wurden schwächer in den mit Wurzelexudaten inkubierten Zellen exprimiert als in den mit Komplexmedium gewachsenen. Da diese Proteine wahrscheinlich Sauerstofflimitierung signalisierten, könnte dieser Zustand im Komplexmedium bedingt durch die hohe Zelldichte erreicht sein und die höhere Expression dieser Proteine erklären.

In der Proteomanalyse wurden insbesondere die erhöhte Expression von ABC-Transportern erkennbar, die zur Verwertung der in den Wurzelexudaten vorhandenen Nährstoffen benötigt wurde. Die Synthese von Transportern für Nährstoffe wie Aminosäuren stellt sicherlich einen Vorteil für die kompetitive Besiedlung in der Rhizosphäre dar. So sind viele Rhizobien, eine Gruppe von α -Proteobakterien (wie *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* und *Azorhizobium*) mit einer Vielzahl solcher Transporter ausgestattet (Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001), ebenso *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002). Beim Wachstum des Bakteriums in Minimalmedium mit Glucose kam es ebenfalls zur Expression der identifizierten ABC-Transporter (Heim *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis impliziert, dass die Weizenkeimlingswurzelexudate als Minimalmedium betrachtet werden können, die neben Aminosäuren im wesentlichen Zucker, wahrscheinlich Glucose, enthalten. Das Bakterium nutzt somit gleiche Komponenten (hier ABC-Transporter) seines genetischen Potentials zur Besiedlung vieler verschiedener ökologischer Areale.

5 Zusammenfassung

- Unter Verwendung des EZ::TNTM <Kan-2> Tnp TransposomeTM Systems wurde eine Transposonmutantenbank mit bisher 3500 *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten generiert. Die Identifizierung der transposonflankierenden DNA-Region zum Aufbau einer Mutationsortdatenbank ergab bisher 353 Integrationsorte in 159 Gene, in vier rRNA-Gene und in zwei nicht-kodierende Bereiche.
- Die willkürliche Integration des auf Tn5-basierenden Transposomsystems wurde anhand des auxotrophen Phänotyps der Mutanten überprüft. Auf diese Weise wurden 122 Tn5-Integrationen in 61 verschiedenen Genen erzeugt. Die größte Anzahl der inaktivierten Gene kodierten für Proteine der Aminosäurebiosynthese. Mit Hilfe der Southernhybridisierung ausgewählter *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten wurde festgestellt, dass jeder Stamm nur eine Integration der Kanamycinresistenzgenkassette im Chromosom trägt.
- Die Tn5-Integration führte bei sieben *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten zu einem Defekt in der Siderophorsynthese und/oder -ausscheidung. Es waren Gene betroffen, die für Siderophorsynthetasen, Transport- und Bindeproteine, Proteine des Energiestoffwechsels und zentralen Intermediärmetabolismus, ein Regulatorprotein und einen Transkriptionsfaktor kodieren.
- Bei zehn Mutanten hatte die Tn5-Integration eine Veränderung in der Biofilmbildung auf abiotischen Oberflächen zur Folge. Hier waren vor allem Gene betroffen, deren Proteine zu den Transport- und Bindeproteinen gehören sowie für zelluläre Prozesse wie der Chemotaxis und Beweglichkeit wichtig sind.
- Die Tn5-Integration in dem *nusB* ("N utilization substance protein B", PP0518), in dem *fur* ("ferric uptake regulator"; PP4730), in dem *ccmF* ("cytochrome c-type biogenesis protein"; PP4322) sowie in einem Siderophorsynthetasegen ("non-ribosomal siderophore peptide synthetase"; PP4219) führte in der jeweiligen Mutante neben dem Defekt in der Siderophorbildung und/oder -ausscheidung ebenfalls zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress.

- Die Transposonintegration in dem *fliG* ("flagellar motor switch protein FliG"; PP4368) und in einem Gen, das für einen Metallionenefflux-RND-Transporter kodiert ("cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter"; PP0043), führte zu einer Unbeweglichkeit der jeweiligen Mutante auf 0,3 %-igem Komplexagar. Eine herabgesetzte geißelgesteuerte Beweglichkeit im Vergleich zum Wildtyp hatte die Tn5-Integration in den Genen *fliM* ("flagellar motor switch protein FliM"; PP 4358) und *nusB* ("N utilization substance protein B"; PP0518) der jeweiligen Stämme zur Folge.
- Die Proteomanalyse zeigte, dass die Tn5-Integration in dem *fliG* bzw. in dem *fliM* zur herabgesetzten Flagellinexpression FliC führt, während die Tn5-Integration in dem RND-Metalleffluxtransporter keine Auswirkung auf die Flagellinexpression FliC hat. Elektronenmikroskopische Aufnahmen machten deutlich, dass die *fliG*-Mutante (23B6) keine Geißeln besitzt. Die ebenfalls geißelunbewegliche Mutante (34F5) mit Tn5-Integration im Metallefflux-RND-Transporter bildete ebenso wie die *fliM*-Mutante (12F8) Geißeln.
- Die Transposonintegration in dem *fliG* führte für den Stamm 23B6 neben der herabgesetzten Fähigkeit zur Biofilmbildung auf einer abiotischen Oberfläche auch zu einer signifikant herabgesetzten Besiedlung von Weizenkeimlingswurzeln in Konkurrenz zum Wildtypstamm. Die Tn5-Integration in einem Gen, das für ein Oberflächenadhäsionsprotein ("surface adhesion protein"; PP0806) kodiert, führte dazu, dass der entsprechende Stamm 1G7 abiotische Oberflächen weniger effizient als der Wildtyp besiedelte, jedoch unter biotischen Bedingungen (Weizenkeimlingswurzeln) in Konkurrenz zum Wildtyp kein Unterschied detektierbar war.
- Proteomanalytische Untersuchungen von *P. putida* KT2440 in der Rhizosphäre von Weizenkeimlingswurzeln im Vergleich zu Kontrollen (KT2440 in Pflanzennährflösung) sowie beim Wachstum des Bakteriums mit Weizenwurzelexudaten und im Vollmedium zeigten verschiedene Proteinexpressionsmuster. Hierbei wurden vor allem Proteine des Energie- und Aminosäurestoffwechsels sowie Transport- und Bindeproteine differentiell exprimiert.

6 Literaturverzeichnis

- Ambrosi, C., L. Leoni und P. Visca. 2002.** Different responses of pyoverdine genes to autoinduction in *Pseudomonas aeruginosa* and the group *Pseudomonas fluorescens-Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4122-6.
- Arai, H., T. Kodama, and Y. Igarashi. 1997.** Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **25**: 1141-8.
- Bachmann, B. J. 1983.** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol Rev.* **47**:180-230.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Rueckert, F. T. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey und K. N. Timmis. 1981.** Specific purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF 1010 derived vectors, and host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- Barret, E. L., Solanes, R. E., Tang, J.S. und N. J. Palleroni. 1986.** *Pseudomonas fluorescens* biovar V: its resolution into distinct component groups and the relationship of these groups to other *P. fluorecens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic pseudomonads with food spoilage. *Journal of General Microbiology* **132**: 2709-2721.
- Bergen, T. 1981.** Human- and animal-pathogenic members of the genus *Pseudomonas*: In: Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. and Schegel, H.G. (eds.). *A Handbook on Habitata, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bjorn, M. J., B. H. Iglewski, S. K. Ives, J. C. Sadoff und M. L. Vasil. 1978.** Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103. *Infect Immun* **19**: 785-91.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau und Y. Shao. 1997.** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-74.
- Blum, H., H. Beier und H. J. Gorss. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Braun, V., und H. Killmann. 1999.** Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104-9.
- Brown, S. M., M. L. Howell, M. L. Vasil, A. J. Anderson und D. J. Hassett. 1995.** Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **177**: 6536-44.
- Budzikiewicz, H. 1993.** Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiol Rev* **10**: 209-28.
- Budzikiewicz, H. 1997.** Siderophores of fluorescent pseudomonads. *Z Naturforsch [C]* **52**: 713-20.
- Buell, C. R. und A. J. Anderson. 1992.** Genetic analysis of the *aggA* locus involved in agglutination and adherence of *Pseudomonas putida*, a beneficial fluorescent pseudomonad. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 154-62.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez und J. H. Short. 1987.** XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**: 376-379.
- Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen und J. C. Venter. 1996.** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-73.
- Caetano-Anolles, G. 1993.** Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl* **3**: 85-94.
- Cordwell, S. J., A. S. Nouwens, N. M. Verrills, J. C. McPherson, P. G. Hains, D. D. Van Dyk und B. J. Walsh. 1999.** The microbial proteome database-an automated laboratory catalogue for monitoring protein expression in bacteria. *Electrophoresis* **20**: 3580-8.
- Cornelissen, C. N. und P. F. Sparling. 1994.** Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **14**: 843-50.
- Coulanges, V., P. Andre, O. Ziegler, L. Buchheit und D. J. Vidon. 1997.** Utilization of iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **65**: 2778-85.
- Crosa, J. H. und C. T. Walsh. 2002.** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 223-49.

- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa und J. R. Penade. 2001.** Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol **183**(9): 2888-96.
- Davis, R. W., D. Botstein und J. R. Roth. 1980.** Advanced bacterial genetics: a manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Darzins, A. 1994.** Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. Mol Microbiol **11**: 137-53.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik und K. N. Timmis. 1990.** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J Bacteriol **172**: 6568-72.
- de Lorenzo, V. 1992.** Genetic engineering strategies for environmental applications. Curr Opin Biotechnol **3**: 227-31.
- de Lorenzo, V., I. Cases, M. Herrero und K. N. Timmis. 1993.** Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with *lacZ*-tet bicistronic reporters. J Bacteriol **175**: 6902-7.
- de Mot, R., P. Proost, J. Van Damme und J. Vanderleyden. 1992.** Homology of the root adhesion of *Pseudomonas fluorescens* OE 28.3 with porin F of *P. aeruginosa* and *P. syringae*. Mol Gen Genet **231**: 489-93.
- de Vrind, J. P., G. J. Brouwers, P. L. Corstjens, J. den Dulk und E. W. de Vrind-de Jong. 1998.** The cytochrome c maturation operon is involved in manganese oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. Appl Environ Microbiol **64**: 3556-62.
- de Weger, L. A., C. I. van der Vlugt, A. H. Wijfjes, P. A. Bakker, B. Schippers und B. J. J. Lugtenberg. 1987.** Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. J Bacteriol **169**: 2769-73.
- de Weger, L. A., M. C. van Loosdrecht, H. E. Klaassen und B. J. J. Lugtenberg. 1989.** Mutational changes in physiochemical cell surface properties of plant-growth-stimulating *Pseudomonas* spp. do not influence the attachment properties of the cells. J Bacteriol **171**: 2756-61.

- de Weger, L. A., van der Bij, A.J., Dekkers, L. C., Simons, M., Wijffelman, C. A. und B. J. J. Lugtenberg. 1995.** Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology* **17**: 221-228.
- Defago, G. und D. Haas. 1990.** *Pseudomonas* as antagonists of soilborne plant pathogens: modes of action and genetic analysis. In: Bollag and Stotsky, G. (eds.). *Soil Biochemistry* **6**: 249-291.
- Dekkers, L. C., C. C. Phoelich, L. van der Fits und B. J. Lugtenberg. 1998 a.** A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7051-6.
- Dekkers, L. C., C. J. Bloemendaal, L. A. de Weger, C. A. Wijffelman, H. P. Spaink und B. J. J. Lugtenberg. 1998 b.** A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 45-56.
- Dekkers, L. C., A. J. van der Bij, I. H. Mulders, C. C. Phoelich, R. A. Wentwoord, D. C. Glandorf, C. A. Wijffelman und B. J. J. Lugtenberg. 1998 c.** Role of the O-antigen of lipopolysaccharide und possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 763-71.
- Derbyshire, K. M., C. Takacs und J. Huang. 2000.** Using EZ::TN™ Transposome™ for Transposon Mutagenesis in *Mycobacterium smegmatis*. *Epicentre Forum* **7**: 1-4.
- Devescovi, G., C. Aguilar, M. B. Majolini, J. Marugg, P. Weisbeek und V. Venturi. 2001.** A siderophore peptide synthetase gene from plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Syst Appl Microbiol* **24**: 321-30.
- Dörr, J., T. Hurek und B. Reinhold-Hurek. 1998.** Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol Microbiol* **30**: 7-17.
- Dower, W. J., J. F. Miller und W. W. Ragsdale. 1988.** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Research* **16**: 6127-6145.
- Dugaiczyk, A., H. W. Boyer und H. M. Goodman. 1975.** Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* **96**: 171-184.
- Dunn, N. W. und I. C. Gunsalus. 1973.** Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **114**: 974-9.

- Enz, S., S. Mahren, U. H. Stroehrer, and V. Braun. 2000.** Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J Bacteriol* **182**: 637-46.
- Erb, R. W., C. A. Eichner, I. Wagner-Döbler und K. N. Timmis. 1997.** Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nat Biotechnol* **15**: 378-82.
- Escobar, L., J. Perez-Martin und V. de Lorenzo. 1999.** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-9.
- Espinosa-Urgel, M., A. Salido und J. L. Ramos. 2000.** Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol* **182**: 2363-9.
- Espinosa-Urgel, M. und J. L. Ramos. 2001.** Expression of a *Pseudomonas putida* aminotransferase involved in lysine catabolism is induced in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5219-24.
- Espinosa-Urgel, M., R. Kolter und J. L. Ramos. 2002.** Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* **148**: 341-3.
- Faude, U. C. 1995.** Immunchemische Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften. PhD Thesis, University of Leipzig, Germany.
- Federal Register. 1982.** Appendix E, Certified host-vector systems. **47**: 17197
- Feist, C. F. und G. D. Hegeman. 1969.** Regulation of the meta cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **100**: 1121-3.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick und *et al.* 1995.** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* **269**: 496-512.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, A. R. Kerlavage, G. Sutton, J. M. Kelley und *et al.* 1995.** The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.
- Frey, J., M. M. Bagdasarian und M. Bagdasarian. 1992.** Replication and copy number control of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **113**: 101-6.
- Fuchs, R., M. Schafer, V. Geoffroy und J. M. Meyer. 2001.** Siderotyping -a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Curr Top Med Chem* **1**: 31-57.
- Gaballa, A., N. Koedam und P. Cornelis. 1996.** A cytochrome c biogenesis gene involved in pyoverdine production in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. *Mol Microbiol* **21**: 777-85.

- Gamliel, A. und J. Katan. 1992.** Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinating seeds in solarized soil. *Phytopathology* **82**: 328-332.
- Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Puhler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dreano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, *et al.*, 2001.** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-72.
- Garrity, G. M., M. Winters und D. B. Searles. 2001.** Taxonomic Outline Of The Prokaryotic Genera, Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology, 2nd edition, Release 1.0, April 2001.
- Gharahdaghi, F., C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai und S. M. Mische. 1999.** Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**: 601-5.
- Gilardi, G. L. 1991.** *Pseudomonas* and related genera. In: Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K.L., Eisenberg, H. D. and Shadomy, H. D. (eds). Manual of Clinical Microbiology (fifth edition). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin und S. G. Oliver. 1996.** Life with 6000 genes *Science* **274**: 563-7.
- Goldman, B. S. und R. G. Kranz. 2001.** ABC transporters associated with cytochrome c biogenesis. *Res Microbiol* **152**: 323-9.
- Goodwin, P. M. und C. Anthony. 1998.** The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* **40**: 1-80.
- Gopal, B., L. F. Haire, R. A. Cox, M. Jo Colston, S. Major, J. A. Brannigan, S. J. Smerdon und G. Dodson. 2000.** The crystal structure of NusB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Struct Biol* **7**: 475-8.
- Görg, A., W. Postel, S. Günther und J. Weser. 1985.** Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on-transfer to the second dimension. *Electrophoresis* **6**: 599-604.
- Goryshin, I. Y. und W. S. Reznikoff. 1998.** Tn5 in vitro transposition. *J Biol Chem* **273**: 7367-74.

- Goryshin, I. Y., J. Jendrisak, L. M. Hoffman, R. Meis und W. S. Reznikoff. 2000.** Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat Biotechnol* **18**: 97-100.
- Guilhabert, M. R., L. M. Hoffman, D. A. Mills und B. C. Kirkpatrick. 2001.** EZ::TN™ Transposome™: A Novel System for Identifying Genes Involved in Bacterial Pathogenesis. *Epicentre Forum* **8**: 1-3.
- Hale, J. E., J. P. Butler, M. D. Knierman und G. W. Becker. 2000.** Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine. *Anal Biochem* **287**: 110-7.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **4**: 557-580.
- Hassett, D. J., P. A. Sokol, M. L. Howell, J. F. Ma, H. T. Schweizer, U. Ochsner und M. L. Vasil. 1996.** Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* **178**: 3996-4003.
- Heim, S., M. Ferrer, H. Heuer, D. Regenhardt; M. Nimtz und K. N. Timmis. 2003.** Proteome reference map of *Pseudomonas putida* KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *P. aeruginosa* strain PAO1 to iron-deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ Microbiol* **5** : 1257-1269.
- Herrero, M., V. de Lorenzo und K. N. Timmis. 1990.** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-67.
- Higgins, C. F. 1992.** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.
- Hirano, S. S. und. Upper, C. D. 1983.** Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **21**: 243-269.
- Hoagland, D. R. und D. I. Arnon. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiments Station Circular* **347**.
- Horowitz, J. P., J. Chua, R. J. Curby, A. J. Thompson, M. A. DA Rooge, B. E. Fischer, J. Mauricio und I. Klundt. 1964.** Substances for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl-beta-D-glycopyranosides. *J. Med.Chem.* **7**: 547-548.

- Hosie, A. H., D. Allaway, C. S. Galloway, H. A. Dunsby und P. S. Poole. 2002.** *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J Bacteriol* **184**: 4071-80.
- Howard, R. J., Garland, J. A. und Seaman, W. L. 1994.** Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada: An Illustrated Compendium. The Canadian Phytopathological Society and The Entomological Society of Canada.
- Hungerford, T. G. 1990.** Diseases of Livestock. McGraw-Hill Book Co., Toronto 9th Edition.
- Irikura, V. M., M. Kihara, S. Yamaguchi, H. Sockett und R. M. Macnab. 1993.** *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J Bacteriol* **175**: 802-10.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpō, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada und S. Tabata. 2000.** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**: 331-8.
- Kihara, M., G. U. Miller und R. M. Macnab. 2000.** Deletion analysis of the flagellar switch protein *FliG* of *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**: 3022-8.
- Kolenbrander, P. E. 1995.** Coaggregations among oral bacteria. *Methods Enzymol* **253**: 385-97.
- LaPointe, G., S. Viau, D. LeBlanc, N. Robert und A. Morin. 1994.** Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D- hydantoinase gene from *Pseudomonas putida* and distribution of homologous genes in other microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **60**: 888-95.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Liao, C. H. 1989.** Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. *Plant disease* **73**: 223-226.
- Lloyd, S. A., H. Tang, X. Wang, S. Billings und D. F. Blair. 1996.** Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for *FliG* but not for *FliM* or *FliN*. *J Bacteriol* **178**: 223-31.

- Lu, C. D., H. Winteler, A. Abdelal und D. Haas. 1999.** The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 2459-64.
- Lugtenberg, B. J. J., L. A. de Weger und J. W. Bennett. 1991.** Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Curr Opin Biotechnol* **2**: 457-464.
- Lugtenberg, B. J. J., L. V. Kravchenko und M. Simons. 1999.** Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology* **1**: 439-446.
- Lynch, D., J. O'Brien, T. Welch, P. Clarke, P. O. Cuiv, J. H. Crosa und M. O'Connell. 2001.** Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **183**: 2576-85.
- Ma, J. F., U. A. Ochsner, M. G. Klotz, V. K. Nanayakkara, M. L. Howell, Z. Johnson, J. E. Posey, M. L. Vasil, J. J. Monaco und D. J. Hassett. 1999.** Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 3730-42.
- Martinez-Bueno, M. A., R. Tobes, M. Rey und J. L. Ramos. 2002.** Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* **4**: 842-55.
- Maruszyk, R. und A. Sergeant. 1980.** A simple method for dialysis of small-volume samples. *Analytical Biochem.* **105**: 403-404.
- Matthysse, A. G., H. A. Yarnall und N. Young. 1996.** Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **178**: 5302-8.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zarsky, M. L. Markelov und S. A. Lukyanov. 1999.** Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* **17**: 969-73.
- Meyer, J. M., A. Stintzi, D. De Vos, P. Cornelis, R. Tappe, K. Taraz und H. Budzikiewicz. 1997.** Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **143**: 35-43.
- Meyer, J. M., A. Stintzi und K. Poole. 1999.** The ferripyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 recognizes the ferripyoverdines of *P. aeruginosa* PAO1 and *P. fluorescens* ATCC 13525. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 145-50.

- Meyer, J. M. 2000.** Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch Microbiol **174**: 135-42.
- Meyer, J. M., V. A. Geoffroy, N. Baida, L. Gardan, D. Izard, P. Lemanceau, W. Achouak und N. J. Palleroni. 2002.** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Appl Environ Microbiol **68**: 2745-53.
- Molina, L., C. Ramos, M. C. Ronchel, S. Molin und J. L. Ramos. 1998.** Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. Appl Environ Microbiol **64**: 2072-8.
- Mossialos, D., U. Ochsner, C. Baysse, P. Chablain, J. P. Pirnay, N. Koedam, H. Budzikiewicz, D. U. Fernandez, M. Schafer, J. Ravel und P. Cornelis. 2002.** Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. Mol Microbiol **45**: 1673-85.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloona. 1987.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Murray, K., C. J. Duggleby, J. M. Sala-Trepat und P. A. Williams. 1972.** The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the meta-cleavage pathway by *Pseudomonas arvilla* mt-2. Eur J Biochem **28**: 301-10.
- Nakata, K., N. Harada, K. Sumitomo und K. Yoneda. 2000.** Enhancement of plant stem growth by flocculation of the antibiotic-producing bacterium, *Pseudomonas fluorescens* S272, on the roots. Biosci Biotechnol Biochem **64**: 459-65.
- Nakazawa, T. und T. Yokota. 1973.** Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. J. Bacteriol **15**: 262-267.
- Neidhardt, F. C., P. L. Bloch und Smith, D. F. 1974.** Culture medium for enterobacteria. J Bacteriol **119**(3): 736-47.
- Nelson, K. E., C. Weinl, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Düsterhoft, B. Tümmeler und C. M. Fraser. 2002.** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environ Microbiol **4**: 799-808.

- Nozaki, M., Kagamiyama, H. und Hayaishi, O. 1963. Crystallization and some Properties of Mestapyrocatechase. Biochemical And Biophysical Research Communications 11.
- Ochsner, U. A., A. I. Vasil, Z. Johnson und M. L. Vasil. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA. J Bacteriol 181: 1099-109.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis. J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.
- O'Sullivan, D. J. und F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogenes. Microbiological Reviews 56: 662-676.
- O'Toole, G. A. und R. Kolter. 1998 a. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28: 449-61.
- O'Toole, G. A. und R. Kolter. 1998 b. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol 30: 295-304.
- O'Toole, G., H. B. Kaplan und R. Kolter. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 54: 49-79.
- Page, M. D. und S. J. Ferguson. 1999. Mutational analysis of the *Paracoccus denitrificans* c-type cytochrome biosynthetic genes *ccmABCDG*: disruption of *ccmC* has distinct effects suggesting a role for CcmC independent of CcmAB. Microbiology 145: 3047-57.
- Palleroni, N. J. 1986. Section 4, family I, Pseudomonadaceae. In P.H.: Sneath, N.S. Mair, E. M. Sharpe, J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Palumbo, J. D., C. I. Kado und D. A. Phillips. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. J Bacteriol 180: 3107-13.
- Pearce, D. A., M. D. Page, H. A. Norris, E. J. Tomlinson und S. J. Ferguson. 1998. Identification of the contiguous *Paracoccus denitrificans* *ccmF* and *ccmH* genes: disruption of *ccmF*, encoding a putative transporter, results in formation of an unstable apocytochrome c and deficiency in siderophore production. Microbiology 144: 467-77.
- Pratt, L. A. und R. Kolter. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol 30: 285-93.

- Pruess, M., W. Fleischmann, A. Kanapin, Y. Karavidopoulou, P. Kersey, E. Kriventseva, V. Mittard, N. Mulder, I. Phan, F. Servant und R. Apweiler. 2003.** The Proteome Analysis database: a tool for the *in silico* analysis of whole proteomes. *Nucleic Acids Res* **31**: 414-7.
- Quadri, L. E. 2000.** Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Mol Microbiol* **37**: 1-12.
- Quigley, N. B. und D. C. Gross. 1994.** Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Mol Plant Microbe Interact* **7**: 78-90.
- Rabilloud, T., J. M. Strub, S. Luche, A. van Dorsselaer und J. Lunardi. 2001.** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**: 699-704.
- Rademaker, J. L. W., F. J. Luows und F. J. De Bruijn. 1998.** Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.4.3**: 1-27.
- Rainey, P. B. und M. J. Bailey. 1996.** Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. *Mol Microbiol* **19**: 521-33.
- Rainey, P. R. 1999.** Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environmental Microbiology* **1**: 243-257.
- Rainey, P. B. und G. M. Preston. 2000.** *In vivo* expression technology strategies: valuable tools for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 440-4.
- Ramos, J. L., A. Stolz, W. Reineke und K. N. Timmis. 1986.** Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8467-71.
- Ramos, J. L., A. Wasserfallen, K. Rose und K. N. Timmis. 1987.** Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**: 593-6.
- Ramos-Diaz, M. A. und J. L. Ramos. 1998.** Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *J Bacteriol* **180**: 6352-63.
- Ratnaningsih, E., S. Dharmsthiti, V. Krishnapillai, A. Morgan, M. Sinclair und B. W. Holloway. 1990.** A combined physical and genetic map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Gen Microbiol* **136**: 2351-7.
- Recht, J., A. Martinez, S. Torello und R. Kolter. 2000.** Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **182**: 4348-51.

- Regenhardt, D., H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernandez, C. Strömpl, E. R. Moore und K. N. Timmis. 2002.** Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 912-5.
- Ren, Q., U. Ahuja und L. Thony-Meyer. 2002.** A bacterial cytochrome c heme lyase. CcmF forms a complex with the heme chaperone CcmE and CcmH but not with apocytochrome c. *J Biol Chem* **277**: 7657-63.
- Rheinwald, J. G., A. M. Chakrabarty und I. C. Gunsalus. 1973.** A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 885-9.
- Riley, M. 1993.** Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **57**: 862-952.
- Rojo, F., D. H. Pieper, K. H. Engesser, H. J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1987.** Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* **238**: 1395-8.
- Roos, S., S. Lindgren und H. Jonsson. 1999.** Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD- box helicase. *Mol Microbiol* **32**: 427-36.
- Römling, U., D. Grothues, W. Bautsch und B. Tümmler. 1989.** A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Embo J* **8**: 4081-9.
- Russo, A., Y. Moenne-Loccoz, S. Fedi, P. Higgins, A. Fenton, D. N. Dowling, M. O'Regan und F. O'Gara. 1996.** Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: 740-5.
- Saiki, R. K., S. J. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Ehrlich und N. Arnheim. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual (2 nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with the chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Sauer, K. und A. K. Camper. 2001.** Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**: 6579-89.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton und D. G. Davies. 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-54.

- Schnider, U., C. Keel, C. Voisard, G. Defago und D. Haas. 1995.** Tn5-directed cloning of *pqq* genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Appl Environ Microbiol* 61: 3856-64.
- Segura, A., E. Duque, G. Mosqueda, J. L. Ramos und F. Junker. 1999.** Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ Microbiology* 1: 191-198.
- Simons, M., H. P. Permentier, L. A. de Weger, C. A. Wijffelman und B. J. J. Lugtenberg. 1997.** Amino Acid Synthesis Is Necessary for Tomato Root colonization By *Pseudomonas fluorescens* Strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 102-106.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni und M. Doudoroff. 1966.** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43: 159-271.
- Stanley, J., D. N. Dowling, M. Stucker und W. J. Broughton. 1987.** Screening cosmid libraries for chromosomal genes: an alternative interspecific hybridization method. *FEMS microbial letters* 48: 25-30.
- Stintzi, A., Z. Johnson, M. Stonehouse, U. Ochsner, J. M. Meyer, M. L. Vasil und K. Poole. 1999.** The *pvc* gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*: role in synthesis of the pyoverdine chromophore and regulation by PtxR and PvdS. *J Bacteriol* 181: 4118-24.
- Suarez, A., A. Güttler, M. Strätz, L. H. Staendner, K. N. Timmis und C. A. Guzman. 1997.** Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* 196: 69-74.
- Taura, T., C. Ueguchi, K. Shiba und K. Ito. 1992.** Insertional disruption of the *nusB* (*ssyB*) gene leads to cold-sensitive growth of *Escherichia coli* and suppression of the *secY24* mutation. *Mol Gen Genet* 234: 429-32.
- Toker, A. S., M. Kihara und R. M. Macnab. 1996.** Deletion analysis of the FlhM flagellar switch protein of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 178: 7069-79.
- Turnbull, G. A., J. A. Morgan, J. M. Whipps und J. R. Saunders. 2001 a.** The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. *FEMS Microbiol Ecol* 35: 57-65.
- Turnbull, G. A., J. A. Morgan, J. M. Whipps und J. R. Saunders. 2001 b.** The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonisation of wheat roots. *FEMS Microbiol Ecol* 36: 21-31.
- Tümmler, B. und L. Wiehland. 1999.** Genomics in *Pseudomonas*. *Biospektrum* 5: 380-382.

- Urban, M., T. Bhargava und J. E. Hamer. 1999.** An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *Embo J* **18**(3): 512-21.
- Vasil, M. L. und U. A. Ochsner. 1999.** The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**: 399-413.
- Venturi, V., C. Ottevanger, M. Bracke und P. Weisbeek. 1995.** Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol Microbiol* **15**: 1081-93.
- Versalovic, J., M. Schneider, F. J. de Bruijn und J. R. Lupski. 1994.** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Cell Mol Biol* **5**: 25-40.
- Vesper, S. J. 1987.** Production of pili fimbriae and a correlation with attachment to corn roots. *Appl Environ Microbiol* **53**: 1397-1405.
- Viera, J. und J. Messing. 1982.** The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Walshaw, D. L. und P. S. Poole. 1996.** The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Mol Microbiol* **21**: 1239-52.
- Walshaw, D. L., C. J. Reid und P. S. Poole. 1997.** The general amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 is negatively regulated by the Ntr system. *FEMS Microbiol Lett* **152**: 57-64.
- Weinel, C., B. Tümmeler, H. Hilbert, K. E. Nelson und C. Kiewitz. 2001.** General method of rapid Smith/Birnstiel mapping adds for gap closure in shotgun microbial genome sequencing projects: application to *Pseudomonas putida* KT2440. *Nucleic Acids Res* **29**: E110.
- Weinel, C., K. E. Nelson und B. Tümmeler. 2002.** Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environ Microbiol* **4**: 809-18.
- Whipps, J. M. 1990.** Carbon economy. In: *The Rhizosphere* (Lynch, J. M., Ed.), pp 59-99. John Wiley and Sons, Chichester.
- Wiedemann, B. und B. A. Atkinson. 1991.** Susceptibility to antibiotics: Species incidence and trends. In Lorian, V. (ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, pp. 962-1208. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Williams, P. A. und K. Murray. 1974.** Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* **120**: 416-23.

- Wolz, C., K. Hohloch, A. Ocaktan, K. Poole, R. W. Evans, N. Rochel, A. M. Albrecht-Gary, M. A. Abdallah und G. Doring. 1994.** Iron release from transferrin by pyoverdin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun **62**: 4021-7.
- Yeoman, K. H., M. J. Delgado, M. Wexler, J. A. Downie und A. W. Johnston. 1997.** High affinity iron acquisition in *Rhizobium leguminosarum* requires the *cycHJKL* operon and the *feuPQ* gene products, which belong to the family of two-component transcriptional regulators. Microbiology **143**: 127-34.
- Zhang, J. H., N. B. Quigley und D. C. Gross. 1995.** Analysis of the *syrB* and *syrC* genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* indicates that syringomycin is synthesized by a thiotemplate mechanism. J Bacteriol **177**: 4009-20.
- Zellars, M. und C. L. Squires. 1999.** Antiterminator-dependent modulation of transcription elongation rates by NusB and NusG. Mol Microbiol **32**: 1296-304.

7 Anhang

7.1 Lokalisierung der Tn5-Integration in näher charakterisierte Gene

Nachfolgend wurde für jede näher charakterisierte Mutante (s. 3) die Lokalisierung der Tn5-Integration in dem entsprechenden Gen und die den betroffenen Genort flankierende Region im *P. putida* KT2400-Genom in den Abbildungen 7.1-7.17 dargestellt (s. Annotationsseite für das jeweilige Gen: <http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePage.spl>: "Region view display"). Die Abbildungen 7.7 und 7.16 wurden mit Hilfe des Programms "Genome Viewer" erstellt, da nur so ein größerer Ausschnitt der flankierenden Region abgebildet werden konnte

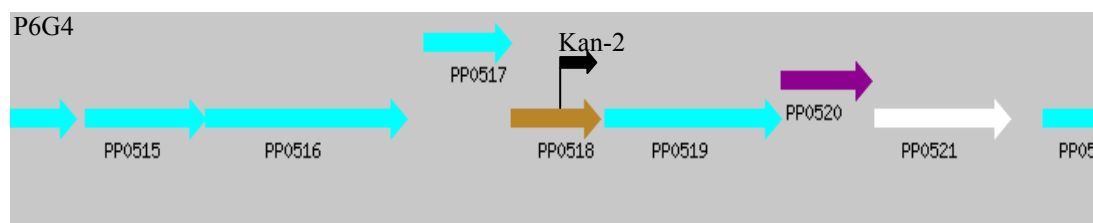


Abb. 7.1 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "N utilization substance protein B" (PP0518) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP0515: riboflavin synthase, α -subunit; PP0516: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase; PP0517: riboflavin synthase, β -subunit; PP0519: thiamine monophosphate kinase; PP0520: phosphatidylglycerophosphatase A; PP0521: conserved hypothetical protein)

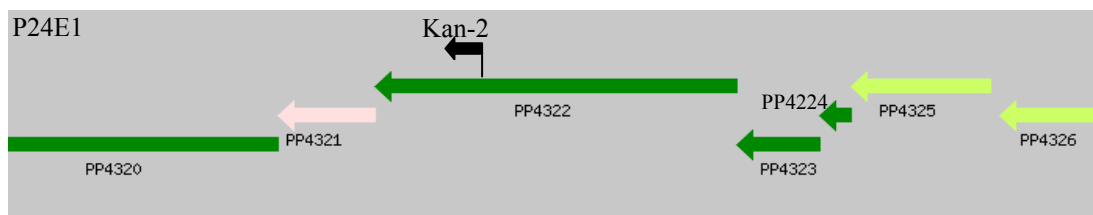


Abb. 7.2 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "cytochrome c-type biogenesis protein CcmF" (PP4322) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4320: cytochrome c-type biogenesis portein CcmH, authentic frameshift; PP4321: thiol:disulfide interchange protein DsbE; PP4323: cytochrome c-type biogenesis protein CcmE; PP4324: cytochrome c-type biogenesis protein CcmD; PP4325: heme ABC export system, permease protein CcmC; PP4326: heme ABC export system, permease protein CcmB).

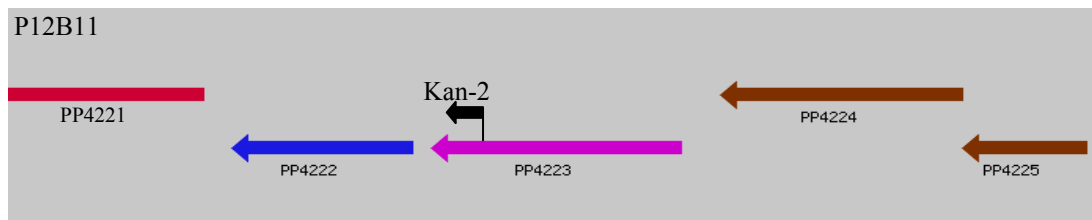


Abb. 7.3 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette in die "diaminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase" (PP4223) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4221: non-ribosomal peptide synthetase; PP4222: syrP protein; PP4224: sensor histidine kinase; PP4225: DNA-binding response regulator)

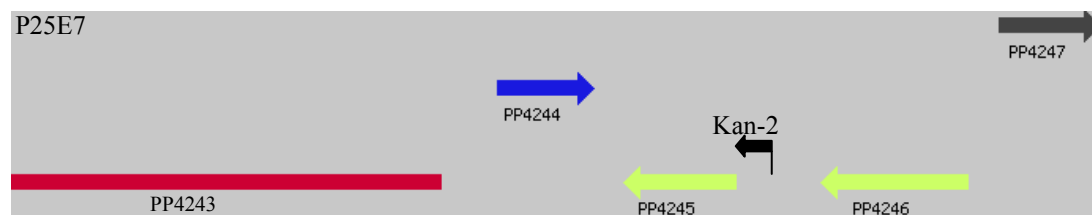


Abb. 7.4 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette zwischen dem "siderophore biosynthesis protein" (PP4245) und dem "periplasmic binding protein" (PP4246) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4243: pyoverdine synthetase; PP4244: ferric regulator *PfrI*; PP4247: exonuclease)

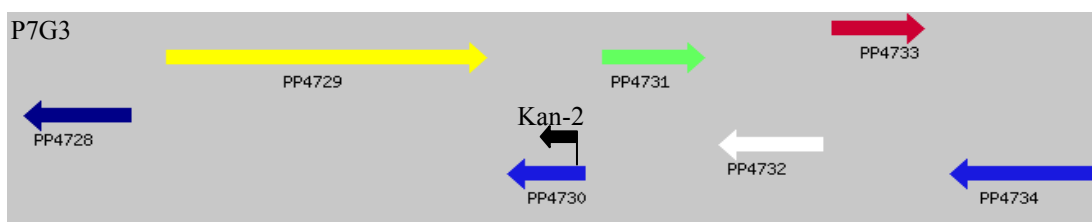


Abb. 7.5 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "ferric uptake regulator" (*fur*) (PP4730) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4728: heat shock protein GrpE; PP4729: DNA repair protein RecN; PP4731: outer membrane lipoprotein OmlA; PP4732: conserved hypothetical protein; PP4733: SsrA-binding protein; PP4734: transcriptional regulator, GntR family)



Abb. 7.6 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette in der "pyoverdine synthetase" (PP4243) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4243: pyoverdine synthetase; PP4244: ferric regulator *PfrI*; PP4247: exonuclease)

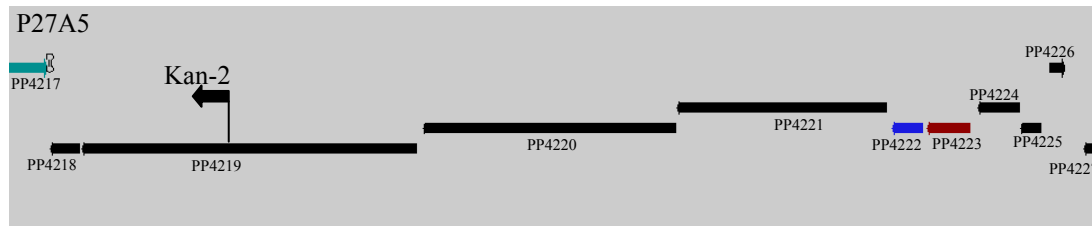


Abb. 7.7 Lokalisierung der Kanamycinresistenzkassette in der "non-ribosomal siderophore peptide synthetase" ppsD (PP4219) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4244: ferric regulator *Pfi*; PP4245: siderophore biosynthesis protein; PP4246: periplasmic binding protein; PP4247: exonuclease)

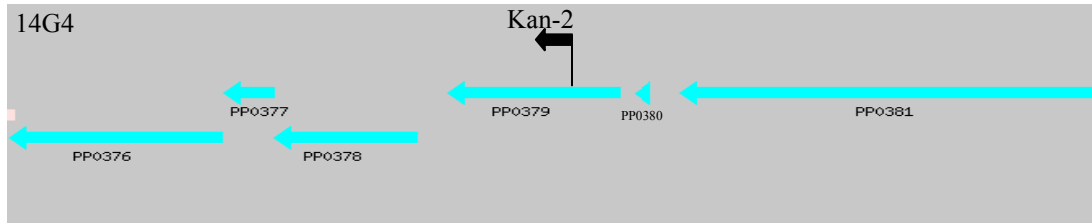


Abb. 7.8 Lokalisierung der Kanamycinresistenzkassette im "coenzyme PQQ synthesis protein B" (PP0379) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP0376: coenzyme PQQ synthesis protein E; PP0377: coenzyme PQQ synthesis protein D; PP0378: coenzyme PQQ synthesis protein C; PP0380: coenzyme PQQ synthesis protein A; PP0381: coenzyme PQQ synthesis protein F)

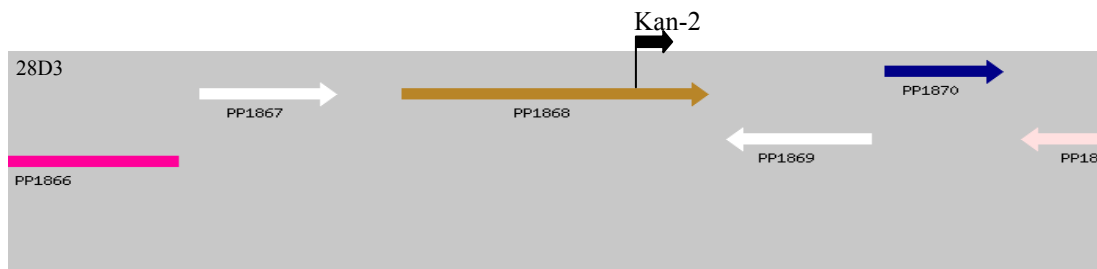


Abb. 7.9 Lokalisierung der Kanamycinresistenzkassette in der "ATP dependent RNA helicase" (PP1868) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP1866 phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, class III; PP1867: conserved hypothetical protein; PP1869: conserved hypothetical protein; PP1870: thiopurine s-methyltransferase; PP1871: heat shock protein HtpX)

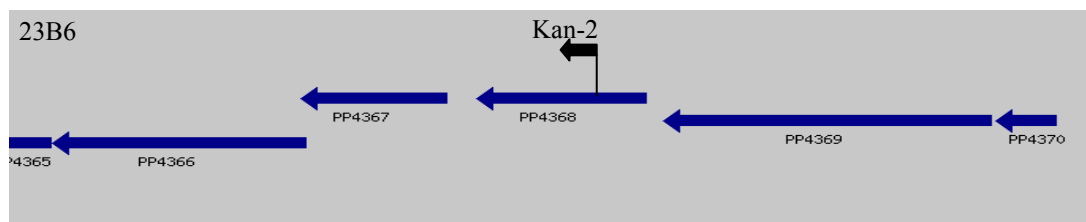


Abb. 7.10 Lokalisierung der Kanamycinresistenzkassette im "flagellar motor switch protein FliG" (PP4368) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4265: flagellar protein FliJ; PP4366: flagellum specific ATP-synthase FliJ; PP4367: flagellar assembly protein FliH; PP4369: flagellar basal body M-ring protein FliF; PP4370: flagellar hook basal-body complex protein FliE)

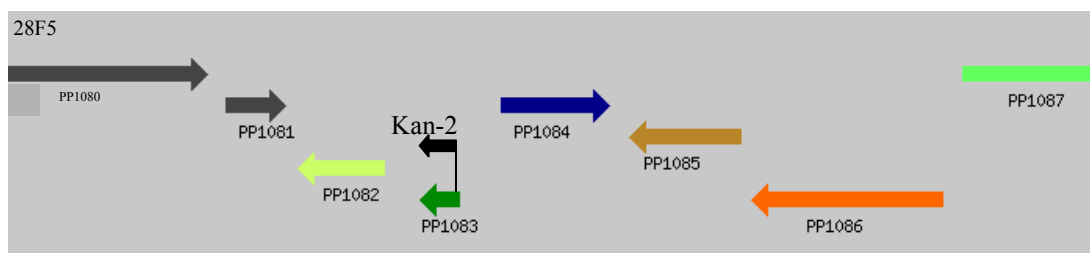


Abb. 7.11 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "bacterioferritin-associated ferredoxin" (PP1083) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP1080: oxidoreductase, putative; PP1081: glutaredoxin-related protein; PP1082: bacterioferritin; PP1084: antioxidant, AhpC/Tsa family; PP1085: ribonuclease T; PP1086: dihydroorotase, homodimeric type; PP1087: outer membrane protein, OmpA family)

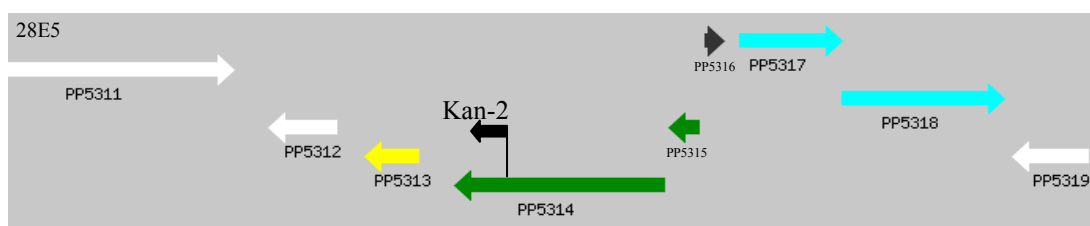


Abb. 7.12 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette in der "rubredoxin reductase rubB" (PP5314) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP5311: conserved hypothetical protein; PP5312: conserved hypothetical protein; PP5313: DNA-binding protein HU-alpha; PP5315: rubredoxin; PP5316: hypothetical protein; PP5317: chorismate-pyruvate lyase, putative; PP5318: 4-hydroxybenzoate polyprenyl transferase; PP5319: conserved hypothetical protein)

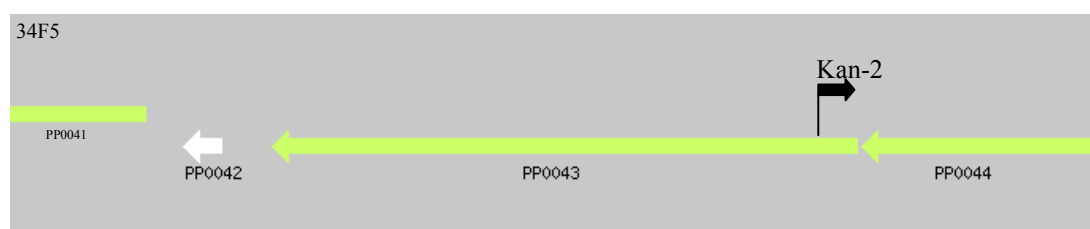


Abb. 7.13 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, permease protein, CzcA family protein" (PP0043) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP0041: cadmium translocating P-type ATPase; PP0042: conserved hypothetical protein; PP0044: cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, membrane fusion protein, CzcB family)

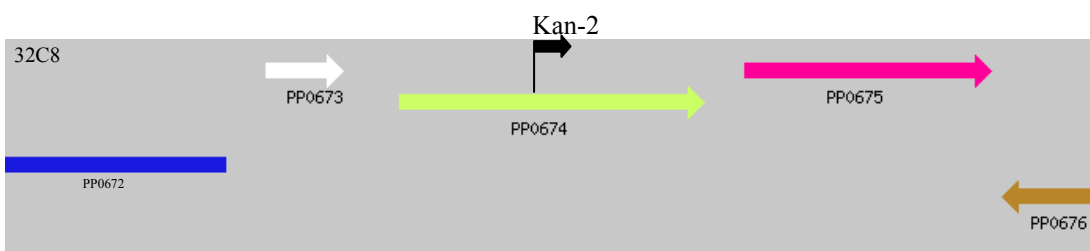


Abb. 7.14 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "ABC transporter; ATP-binding protein" (PP0674) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP0672: sensory box protein; PP0673: conserved hypothetical protein; PP0675: glutamate dehydrogenase; PP0676: transcription elongation factor, putative)

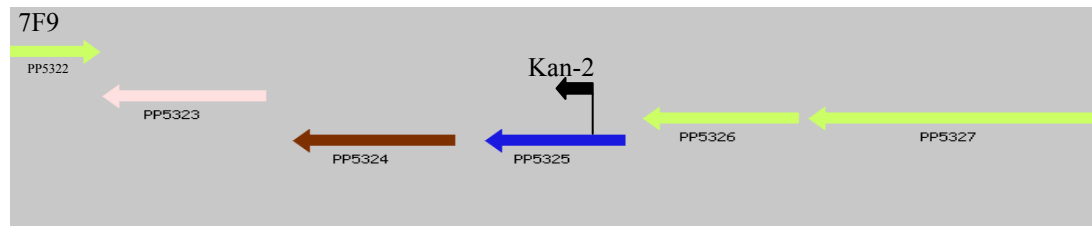


Abb. 7.15 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "phosphate transport system regulator protein" PhoU (PP5325) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP5322: metal ion transporter, putative; PP5323: petidase, M23/M37 family; PP5324: response regulator; PP5326: phosphate ABC transporter, ATP-binding protein; PP5327: phosphate ABC transporter, permease protein)

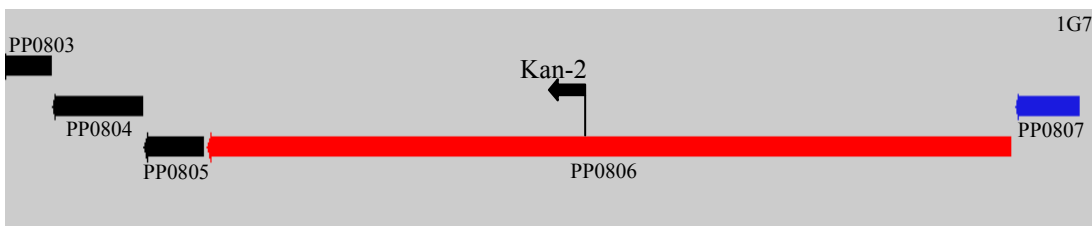


Abb. 7.16 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "surface adhesion protein" (PP0806) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP0803: protein secretion ABC efflux system, membran fusion protein; PP0804: protein secretion ABC efflux system, permease and ATP-binding protein; PP0807: sigma 54-dependent transcriptional regulator)

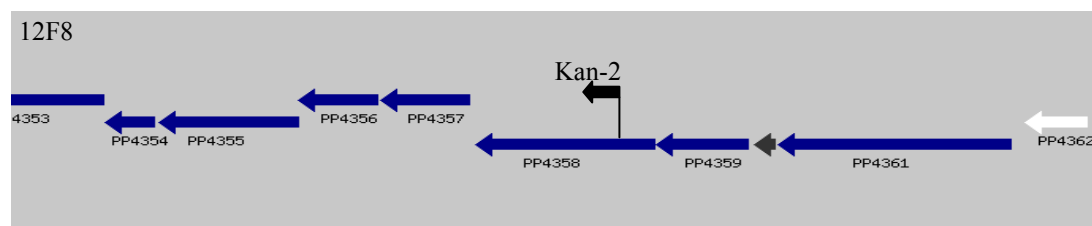


Abb. 7.17 Lokalisierung der Kanamycinresistenzgenkassette im "flagellar motor switch protein FliM" (PP4358) im *P. putida* KT2440-Genom

(PP4253: flagellar biosynthetic protein FliR; PP4354: flagellar biosynthetic protein FliQ; PP4355: flagellar biosynthetic protein FliP; PP4356: flagellar assembly protein FliO; PP4357: flagellar motor switch protein FliN; PP4359: flagellar protein FliL; PP4360: hypothetical protein; PP4361: flagellar hook-length control protein FliK; PP4362: conserved hypothetical protein)

7.2 Identifizierung der transposonflankierenden Region der *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten

Die Tabelle 7.1 zeigt die identifizierte transposonflankierende DNA-Region aller Mutanten mit auxotrophen Phänotyp (AUX-Klone), die Genomlokalisierung (PP-Nummer), das Gen und die entsprechende Enzymnummer (E.C.-Number). In der Legende wurde die Zuordnung der transposonflankierenden Region (Proteine) entsprechend ihrer Funktion/ Aufgabe in der Zelle vorgenommen.

Tab. 7.1 Identifizierung der transposonflankierenden Region aller auxotropher *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten

AUX-Klon/ Klone*	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom (function) ⁺	Genomloka- lisierung (locus name) ⁺	Gen (gene symbol) ⁺	E.C. #
014	Tryptophan synthase beta chain ¹	PP0083	<i>trpB</i>	4.2.1.20
033/ 037/ 102	Anthranilate synthase component I ¹	PP0417	<i>trpE</i>	4.1.3.27
006	Homoserine dehydrogenase ²	PP1470	<i>hom</i>	1.1.1.3
053	Threonine synthase ²	PP1471	<i>thrC</i>	4.2.99.2
056	O-succinylhomoserine sulfhydrylase ²	PP2001	<i>metZ</i>	4.2.99.-
041/ 050/ 085	Dihydrodipicolinate reductase ²	PP4725	<i>dapB</i>	1.3.1.26
097	Zwischen PP2425 und PP2426			
003/ 090	Homoserine O-acetyltransferase ²	PP5097	<i>metX</i>	2.3.1.31
057/ 110	Argininosuccinate lyase ³	PP0184	<i>argH</i>	4.3.2.1
040/ 096/ 098/ 105	Argininosuccinate synthase ³	PP1088	<i>argG</i>	6.3.4.5
025	N-acetylglutamate synthase ³	PP5185	<i>argA</i>	2.3.1.1
013/ 073	Acetylglutamate kinase ³	PP5289	<i>argB</i>	2.7.2.8
045	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase ⁴	PP0289	<i>hisB</i>	4.2.1.19
071	Glutamine amidotransferase ⁴	PP0290	<i>hisH</i>	2.4.2.-
019/ 072/ 101	Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase ⁴	PP0292	<i>hisA</i>	5.3.1.16
010/ 099	Imidazoleglycerol-phosphate synthase, cyclase subunit ⁴	PP0293	<i>hisF</i>	—
016/ 091	ATP-phosphoribosyltransferase ⁴	PP0965	<i>hisG</i>	2.4.2.17
070/ 083/ 088/ 106	Histidinol dehydrogenase ⁴	PP0966	<i>hisD</i>	1.1.1.23
017/ 035/ 054 /060/ 061/ 081	Histidinol-phosphate aminotransferase ⁴	PP0967	<i>hisC</i>	2.6.1.9
052	2-isopropylmalate synthase ⁵	PP1025	<i>leuA</i>	4.1.3.12
002/ 039	Ketol-acid-Reductoisomerase ⁵	PP4678	<i>ilvC</i>	1.1.1.86

AUX-Klon/ Klone *	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom (function) ⁺	Genomloka- lisierung (locus name) ⁺	Gen (gene symbol) ⁺	E.C. #
075	Acetolactate synthase, small subunit ⁵	PP4679	<i>ilvN</i>	4.1.3.18
044/ 066/ 100	Acetolactate synthase, large subunit, biosynthetic type ⁵	PP4680	<i>ilvB</i>	4.1.3.18
059/ 125/ 126	Dihydroxy-acid dehydratase ⁵	PP5128	<i>ilvD</i>	4.2.1.9
048	3-phosphoserine aminotransferase ⁶	PP1768	<i>serC</i>	2.6.1.52
012	Phosphoserine phosphatase ^{6/A}	PP4909	<i>serB</i>	3.1.3.3
027	D-3 phosphoglycerate dehydrogenase ⁶	PP5155	<i>serA</i>	1.1.1.95
022/ 024/ 026	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase ⁷	PP1037	<i>purL</i>	6.3.5.3
005/ 123	Phosphoribosylformylglycinamidine cyclo-ligase ⁷	PP1665	<i>purM</i>	6.3.3.1
020/ 021/ 036	Amidophosphoribosyltransferase ⁷	PP2000	<i>purF</i>	2.4.2.14
023/ 095	Phosphoribosylamine-glycine ligase ⁷	PP4823	<i>purD</i>	6.3.4.13
082	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit ⁷	PP5335	<i>purK</i>	4.1.1.21
108	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit ⁷	PP5336	<i>purE</i>	4.1.1.21
124	Dihydroorotase, homodimeric type ⁸	PP1086	<i>pyrC</i>	3.5.2.3
121	Orotidine 5-phosphate decarboxylase ⁸	PP1815	<i>pyrF</i>	4.1.1.23
038/ 049/ 092 /104 /115/ 118	Carbamoyl-phosphate synthase, large subunit ⁸	PP4723	<i>carB</i>	6.3.5.5
007/ 015/ 018/ 043/ 055/ 086/ 093 /103/ 111	Carbomyl-phosphatesynthase, small chain ⁸	PP4724	<i>carA</i>	6.3.5.5
113	Aspartate carbamoyltransferase ⁸	PP4998	<i>pyrB</i>	2.1.3.2
030/ 046	Orotate phosphoribosyltransferase ⁸	PP5291	<i>pyrE</i>	2.4.2.10
044/ 076/ 078/ 084	Adenosylhomocysteinase authentic frameshift ⁹	PP4976	<i>ahcY</i>	2.4.2.19
094	Enolase ¹⁰	PP1612	<i>eno</i>	4.2.1.11
037/ 089	Triosephosphate isomerase ¹⁰	PP4715	<i>tpiA</i>	5.3.1.1
031/ 062	Malate:quinone oxidoreductase ¹¹	PP0751	<i>mgo-1</i>	1.1.99.16
120	Fumarate hydratase, class I ¹¹	PP0897	—	4.2.1.2
058/ 077	2-oxoglutarate dehydrogenase, dihydrolipoamide succinyltransferase ¹¹	PP4188	<i>kgdB</i>	2.3.1.61
008/ 051 /107	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component ¹¹	PP4189	<i>kgdA</i>	1.2.4.2
109	Succinate dehydrogenase, flavoprotein ¹¹	PP4191	<i>sdhA</i>	1.3.99.1
034	Succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein ¹¹	PP4192	<i>sdhD</i>	—
112/ 117	Succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit ¹¹	PP4193	<i>sdhC</i>	—
009	Citrate synthase ¹¹	PP4194	<i>gltA</i>	4.1.3.7
029	Lipoic acid synthetase ¹³	PP4800	<i>lipA</i>	—
028	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase ¹⁴	PP4699	<i>panB</i>	2.1.2.11

AUX-Klon/ Klone *	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom (function) ⁺	Genomloka- lisierung (locus name) ⁺	Gen (gene symbol) ⁺	E.C. #
047/ 074	Pantotate- β -alanin-ligase ¹⁴	PP4700	<i>panC</i>	6.3.2.1
032	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase ¹⁵	PP0787	<i>nadC</i>	2.4.2.19
042	Phosphomethylpyrimidine kinase ¹⁶	PP4782	<i>thiD</i>	2.7.4.7
067/ 080	Sulfite reductase hemoproteine, β -subunit ¹⁷	PP2371	<i>cysI</i>	1.8.12
068	C4-type zinc finger protein, DksA/Tra family ¹⁸	PP4693	<i>dksA</i>	—
064/ 065 /069	Histidyl-tRNA synthetase, putative ¹⁹	PP4890	—	—
119/ 122	Lipoate-protein ligase B ²⁰	PP4801	<i>lipB</i>	—
001	Aminotransferase, classI ²¹	PP0817	—	—
079	Flagellar biosynthetic protein FliQ ²²	PP4354	—	—

* interne Klonbezeichnung

E.C. #: Enzyme commission number

⁺ offizielle Bezeichnung von TIGR

— keine Angabe

Amino acid biosynthesis ¹ aromatic amino acid family ² aspartate family ³ glutamate family ⁴ histidine family ⁵ pyruvate family ⁶ serine family	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers ¹³ lipoate ¹⁴ pantothenate and coenzyme A ¹⁵ pyridine nucleotides ¹⁶ thiamine ^A pyridoxine
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides ⁷ puine ribonucleotide biosynthesis ⁸ pyrimide ribonucleotide biosynthesis	Central intermediary metabolism ¹⁷ sulfur metabolism Regulatory functions ¹⁸ DNA interactions
Energy metabolism ⁹ amino acid and amines ¹⁰ glycolysis/gluconeogenesis ¹¹ TCA cycle ¹² sugars	Protein synthesis ¹⁹ tRNA aminoacylation Protein fate ²⁰ Protein modification and repair
Unknown function ²¹ enzyme of unknown specificity	Cellular processes: ²² Chemotaxis and motility

Die Tabelle 7.2 zeigt die identifizierte transposonflankierende Region der bisher genotypisch analysierten Mutanten (konservierte Mutanten in den Mikrotiterplatten 1-3 und 29; Klon/Klone: Zahl = Plattennummer, Buchstabe + Zahl = Position auf der Platte) mit der entsprechenden Genomlokalisierung (PP-Nummer). Ausgenommen wurden hier die auxotrophen Mutanten (s. Tab. 7.1) sowie die Siderophordefekt- und Biofilmdefektmutanten. In der Legende wurde die Zuordnung der transposonflankierenden Region (Proteine) entsprechend ihrer Funktion/Aufgabe in der Zelle vorgenommen.

Tab. 7.2 Identifizierung der transposonflankierenden Region der *P. putida* KT2440::Tn5(Kan^r)-Mutanten (konservierte Mutanten in den Mikrotiterplatten 1-3 und 29)

Klon/Klone*	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom	Genomlokalisierung	Funktion/ Zelluläre Aufgabe ⁺
3G09	Argininosuccinate lyase	PP0184	1 A
2C03	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	PP0340	1 A
29C10	Ornithine carbamoyltransferase	PP1079	1 A
29C11	2-isopropylmalate synthase	PP1025	1 B
1A09/1D03/3A11/3A12	8-amino-7-oxononanoate synthase	PP0363	2 A
1E06/1E07/2A03/2C06/2H08/ 3F02/3H03/3H04/3E05/ 3E06/3B08	Biotin biosynthesis protein BioC	PP0365	2 A
29C08	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II	PP0516	2 B
29F12	Mannose-6-phosphate isomerase /mannose-1-phosphate guanylyltransferase	PP1776	3 A
3D02/3E03	Phosphomannomutase	PP1777	3 A
29C12	Mannosyltransferase, putative	PP1780	3 A
1A02/1B02/1C02/1G08/ 1D12/1F11/2E07/2G07/2A09/ 2B11/2D11/2E11/2F11/2F12/ 2G11/2H11/3D07/3B09/ 3F10	Glycosyl transferase, group 2 family protein	PP1793	3 A
29E06	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	PP1334	3 B
1F02/1F03/1D06/2G02/2A05/ 2A11/2A12/3A06	Outer membrane lipoprotein Blc, putative	PP5037	3 C
1H03/1D05/1D07/1G07/ 1B12/1C12/2B06/3D06	Surface adhesion protein, putative	PP0806	4 A
1F12	Flagellar basal-body rod modification protein FlgD	PP4389	4 B
29C03	Antioxidant, AhpC/Tsa family	PP1084	4 C
29G08	Alkyl hydroperoxide reductase, C subunit	PP2439	4 C

Klon/Klone*	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom	Genomlokalisation	Funktion/ Zelluläre Aufgabe ⁺
1F05/1F06/1H07/1C09/2H03/2G09/2C11/2C12/3B12	Cardiolipin synthase	PP5364	4 D
1E08/1G12	NADH pyrophosphatase, putative	PP4029	5
2A01	Excinuclease ABC, A subunit	PP0483	6 A
1H02/1F07	Exodeoxyribonuclease VII, large subunit	PP1027	6 B
1E04/3C03	Ethanolamine ammonia-lyase, light subunit, putative	PP0542	7 A
2A06/2H06	Alanine racemase, catabolic	PP5269	7 A
2D01/2E01/2F01	Pyridine nucleotide transhydrogenase, alpha subunit, authentic frameshift	PP0156	7 B
29F06	Cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit II	PP0812	7 B
1G05/2F02/2D06/2F09/3A04/3G10/3H10	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	PP2151	7 B
29H01	NADH dehydrogenase I, G subunit	PP4124	7 B
3F06	NADH dehydrogenase I, J subunit	PP4127	7 B
29D11	Thioredoxin	PP5215	7 B
1F01/1G03/1A05/1B11	Rubredoxin reductase	PP5314	7 B
1D01/1G10/2B05	Aldehyde dehydrogenase family protein	PP5278	7 C
29A11	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, authentic frameshift	PP0253	7 D
29E05	1-phosphofructokinase	PP0794	7 D
29B03	Glucose-6-phosphate isomerase	PP1808	7 D
1H06/3D09	Glycerol kinase	PP1075	7 E
1E02/2C02/2D05/2D07/2C09/2E09/2D12	Glucose dehydrogenase (pyrroloquinoline-quinone)	PP1444	7 E
1B09	Catechol 1,2-dioxygenase	PP3713	7 E
29A05	6-phosphogluconate dehydrogenase	PP4043	7 F
29D01	Hypothetical protein	PP0752	8 A
29A03	Hypothetical protein	PP4117	8 A
2E10/ 2F10	Conserved hypothetical protein	PP0093	8 B
29F08	Conserved hypothetical protein	PP0266	8 B
2G05	Conserved hypothetical protein	PP0430	8 B
2E03/2D08/2E08/2G08/	Conserved hypothetical protein	PP0761	8 B
29D12	Conserved hypothetical protein	PP0821	8 B
29B11	Conserved hypothetical protein	PP1702	8 B
1A03/1C03/1B08/1F08/1B10/2B04/2B09/3C05/3A10	Conserved hypothetical protein	PP1838	8 B
1E01/2F04/2F07	Conserved hypothetical protein	PP1993	8 B
1G09/3C11	Conserved hypothetical protein	PP2462	8 B
29B04	Conserved hypothetical protein	PP3097	8 B
2A04/ 3A01	Conserved hypothetical protein	PP4268	8 B
29A12	Conserved hypothetical protein	PP4590	8 B
1C08/ 1A10	Metalloprotease, insulinase family	PP0144	9 A
29B07	ATP-dependent protease La	PP2302	9 A
29D02	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type	PP1714	9 B

Klon/Klone*	Transposonflankierende Region im <i>P. putida</i> KT2440-Genom	Genomlokalisation	Funktion/ Zelluläre Aufgabe ⁺
29B08	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PP2903	9 B
29E08	Queuine tRNA-ribosyltransferase	PP0833	10
29D05	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase C	PP1906	10
29G02	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase, putative	PP0747	11
1D04/ 2C08	DNA-binding response regulator OmpR	PP0246	12 A
1B05/ 1F04/ 3A03	Transcriptional regulatory protein PhoP	PP1186	12 A
1B07/ 3D05	Transcriptional regulator, GntR family	PP4345	12 A
2C07/ 3C01/	Transcriptional regulator, MarR family	PP4515	12 A
29D04/	Transcriptional regulator, LysR family	PP4579	12 A
1B01/ 3H11	Transcriptional regulator, GntR family	PP4734	12 A
1D10/ 1D11/ 1G11/ 2H09	Transmembrane sensor, putative	PP0668	12 B
29F01	Sensory box histidine kinase	PP0132	12 C
1F09/ 1F10/ 1G01/ 2A07/ 2B07	Sensor histidin kinase	PP4781	12 C
1C05	Sensor protein PfeS	PP0533	13
29A12	Ribonuclease D	PP4591	14
2C04/ 2C05/ 2F08/ 2H07	Dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein	PP0879	15 A
3F05	Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein, putative	PP0824	15 B
1H11/ 2H10	Glutathione-regulated potassium-proton antiporter	PP5246	15 C
29F07	TonB-dependent receptor	PP1446	15 C
1C01	Major facilitator family transporter	PP2553	15 D
1C04	Oxidoreductase, FMN-binding	PP0310	16 A
1A04/ 1A11/ 2H05/ 3H02/ 3C06/ 3H06/ 3E11	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family	PP0429	16 A
1E05/ 1C10/ 2G06	Aminotransferase, class I	PP0817	16 A
29D07	Metallo-beta-lactamase family protein	PP1239	16 A
1C06/ 1E10/ 2D04	D-amino acid oxidase family protein	PP1751	16 A
1A07/ 1A08/ 3E10	GGDEF domain protein	PP0129	16 B
29E11	S1 RNA binding domain protein	PP0245	16 B
3D04	GGDEF domain protein	PP0798	16 B
1H05	rhodanese domain protein	PP5055	16 B
2F03	Epimerase/dehydratase-related protein	PP5305	16 B
3G01/ 3A05	Transketolase domain protein	PP5367	16 B
1E11/ 29E04/ 29B10/ 29C07	23 S rRNA	—	—

* interne Klonbezeichnung — keine Angabe

⁺ offizielle Bezeichnung von TIGR

1: Amino acid biosynthesis A: glutamate family B: pyruvate family	8: Hypothetical proteins A: hypothetical B: conserved
2: Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers A: Biotin B: Riboflavin, FMN, and FAD	9: Protein fate A: degradation of proteins, peptides, and glycopeptides B: Protein folding and stabilization
3: Cell envelope A: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides B: Biosynthesis of murein sacculus and peptidoglycan C: other	10: Protein synthesis: tRNA and rRNA base modification 11: Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides Salvage of nucleosides and nucleotides
4: Cellular processes: A: Cell adhesion B: Chemotaxis and motility C: Detoxification D: Toxin production and resistance	12: Regulatory functions: A: DNA interactions B: other C: Protein interactions
5: Central intermediary metabolism other	13: Signal transduction: Two-component systems
6: DNA metabolism A: replication, recombination, repair B: degradation of DNA	14: Transcription: RNA processing
7: Energy metabolism A: amino acid and amines B: electron transport C: fermentation D: glycolysis/gluconeogenesis E: other F: pentose phosphate pathway	15: Transport and binding proteins A: Amino acids, peptides and amines B: anions C: cations D. unknown substrates 16: Unknown function: A: Enzymes of unknown specificity B: general

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis für die Ermöglichung dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe Mikrobielle Ökologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH danken. Ich bedanke mich für die gewährte Unterstützung und für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein großer Dank gilt Frau Dr. Sabina Heim und Herrn Dr. Michael Strätz für die sehr gute Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit. Ihre Geduld und ihr ermutigender Optimismus haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Verena Heindl. Unsere Zusammenarbeit hat sehr großen Spaß gemacht, und ihre ansteckende Fröhlichkeit half mir über so manche Durststrecke hinweg. Ich danke für die tatkräftige Unterstützung bei meiner Arbeit, insbesondere bei den AUX-Klonen und dem "garstigen" Southern Blot.

Herrn Dr. Dirk F. Wenderoth und Frau Dr. Heike "Lotte" Görres danke ich für die engagierte Durchsicht des Manuskripts und ihre aufmunternde Art.

Ein großes Dankeschön geht an das Labor D008 mit allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern Agnes, Annette, Blanca, Brigitte, Carsten, Daniela, Dirk, Ed, Holger, Kerstin, Lilli, Massimo, Theresa, Toni, Robert, Roland und Sabina. Die hilfsbereite Art, die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre haben mir immer wieder Spaß bereitet und zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Special thanks to Massimo for the nice cooperation in our small "proteome team".

Ferner möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie danken, die mir mit Rat und Tat behilflich waren.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen der "Proteomgruppe" aus dem A-Gebäude bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Lothar Jänsch und Herrn Dr. Josef Wissing, für die geduldige Beantwortung meiner Fragen zu diesem Thema.

Ein Dankeschön auch an Herrn Dr. Max Schobert und Herrn Martin Eschbach aus der Abteilung für Mikrobiologie an der TU Braunschweig für ihre Hilfsbereitschaft in Sachen 2 D-Gelelektrophorese und Transposonmutanten.

Meinen "Göttingern" mit Christine, Jan, Katja, Marion und Susanne sage ich Dank für die gemeinsamen Unternehmungen während der Doktorandenzeit.

Vielen Dank auch an Uli, Sabine und Andrea für die tollen Wandertouren. Ein ganz besonderer Dank geht noch an Uli für das gewissenhafte Lesen von Teilen des Manuskripts, die gemeinsame Tischtennissaison sowie für ihre aufmunternde und motivierende Art.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Nicole für den stets gewährten Rückhalt jeglicher Art während meiner gesamten Studienzeit ganz herzlichbedanken.

Lebenslauf

25.08.1971	Geburt in Osterode am Harz
1978 bis 1982	Besuch der Grundschule in Lasfelde
1982 bis 1984	Besuch der Orientierungsstufe in Osterode am Harz
1984 bis 1991	Besuch des Gymnasiums in Osterode am Harz
28.05.1991	Abitur
08/1991 bis 01/1994	Ausbildung zur Chemielaborantin am Universitätsklinikum in Göttingen
10/1993	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen für das Studienfach Biologie
10/1995	Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie und physikalische Chemie
02/1998	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Immunologie und organische Chemie
05/1998 bis 05/1999	Diplomarbeit in der Abteilung von Prof. Dr. G. Gottschalk am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen mit dem Thema: "Auffindung von industriell interessanten Exoenzymen in Umweltgenbanken"
06/1999 bis 09/1999	wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung von Prof. Dr. G. Gottschalk am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen
09/1999 bis 01/2000	wissenschaftliche Hilfskraft im Genomlabor am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen
02/2000	Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

